

DER MALAT-ASPARTAT-ZYKLUS:
ein Mechanismus für den Transport von
reduzierenden Äquivalenten zwischen Zytosol
und Mitochondrien

Peter Zimmer

1974

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
und Physikalische Biochemie der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher -
Prof. Dr. E. M. Klingenberg - Prof. Dr. H. G. Zachau -

DER MALAT-ASPARTAT-ZYKLUS:

ein Mechanismus für den Transport von reduzierenden
Äquivalenten zwischen Zytosol und Mitochondrien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Zimmer

aus

München

1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Roland Scholz
2. Prof. Dr. Dr. Theodor Bücher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Miller

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 26.3.1974

Inhalt des Buches

Seite

1. Einführung

1

2. Hauptteil

2

2.1. Allgemeines über die Bedeutung der

3

2.1.1. Die Bedeutung der

4

2.1.2. Die Bedeutung der

5

2.1.3. Die Bedeutung der

6

2.1.4. Die Bedeutung der

7

2.1.5. Die Bedeutung der

8

2.1.6. Die Bedeutung der

9

2.1.7. Die Bedeutung der

10

2.1.8. Die Bedeutung der

11

2.1.9. Die Bedeutung der

12

2.1.10. Die Bedeutung der

13

in Dankbarkeit gewidmet

3. Schluss

14

3.1. Die Bedeutung der

15

3.1.1. Die Bedeutung der

16

3.1.2. Die Bedeutung der

17

3.1.3. Die Bedeutung der

18

3.1.4. Die Bedeutung der

19

3.1.5. Die Bedeutung der

20

3.1.6. Die Bedeutung der

21

3.1.7. Die Bedeutung der

22

3.1.8. Die Bedeutung der

23

3.1.9. Die Bedeutung der

24

3.1.10. Die Bedeutung der

25

3.1.11. Die Bedeutung der

26

3.1.12. Die Bedeutung der

27

3.1.13. Die Bedeutung der

28

3.1.14. Die Bedeutung der

29

3.1.15. Die Bedeutung der

30

3.1.16. Die Bedeutung der

31

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Methodik</u>	6
2.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion	6
2.1.1. Perfusionsapparatur	7
2.1.2. Perfusionslösung	10
2.1.3. Volumenbestimmung	11
2.1.4. Operationstechnik	11
2.1.5. Die isolierte Leber unter den Bedingungen der Perfusion	12
2.2. Sauerstoffmessung	12
2.3. Oberflächenfluorometrie	13
2.4. Metabolitbestimmung	15
2.5. Die perfundierte Leber als ein Modell	16
3. <u>Ergebnisse</u>	18
3.1. Stoffwechselwirkungen von Aminooxyacetat	18
3.1.1. Sauerstoffaufnahme	18
3.1.2. Glykogenabbau und Glycolyse	19
3.1.3. Gluconeogenese	19
3.1.4. Harnstoffsynthese	28
3.1.5. Ketogenese	28
3.2. Änderungen im Redoxzustand der Leber	29
3.2.1. Redoxquotienten im Perfusat	30
3.2.2. Oberflächenfluoreszenz	33
3.3. Auswirkungen von Aminooxyacetat auf den Äthanolabbau	34
3.3.1. Äthanolabbau in Anwesenheit von Aminooxyacetat und Inhibitoren der Atmungskette	38
3.3.2. Titration von Aminooxyacetat	39

4.	<u>Diskussion</u>	46
4.1.	Aminooxyacetat, ein Hemmstoff von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen	46
4.2.	Unspezifische Bindung von Carbonyl-Gruppen durch AOA	47
4.3.	Hemmung des intrazellulären Wasserstofftransportes durch AOA	51
4.4.	Hemmung des Äthanolabbaus	53
4.5.	Der Kohlenhydrat-Metabolismus in Anwesenheit von Aminooxyacetat	55
4.6.	Der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von Aminooxyacetat	58
4.7.	Redoxänderungen nach Zugabe von Aminooxyacetat	59
5.	<u>Zusammenfassung</u>	63

Anhang:

Verzeichnis der Abkürzungen

Literatur

1. Einleitung

Das Elektronenmikroskop hat unsere Vorstellung von der subzellulären Architektur erweitert. In vielen Fällen ist es gelungen, bestimmte Stoffwechselwege genau umschriebenen Strukturen zuzuordnen. So erkannte man z.B. in den Mitochondrien den Ort der Endoxidation von präformierten Abbauprodukten des Kohlenhydrat-, Protein- und Fettkatabolismus (Pyruvat, α -Ketoglutarat, Oxaloacetat, Fettsäuren, Acetyl-CoA, etc.) sowie den Ort der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. Die primären Reaktionsschritte der Glycolyse, des Lipid-, Protein- und Alkoholmetabolismus laufen dagegen im Cytoplasma ab, d.h. in einem Raum, der von Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums durchzogen wird, sonst aber als nicht weiter strukturiert erscheint und der deshalb auch "Zellsaft" oder "Cytosol" genannt wird. Glycolyse auf der einen Seite, Zitratzyklus und Atmungskette auf der anderen Seite der trennenden Mitochondrienmembran bilden ein Ganzes, ohne dessen Zusammenwirken der Energiestoffwechsel der Zelle undenkbar ist.

Bei der Oxidation von Glucose und Alkohol entstehen neben den Produkten wie Pyruvat (das allerdings auch aus dem Glycerin des Fettabbaus und aus dem Aminosäurenkatabolismus entstehen kann) und Acetat reduzierende Äquivalente in Form von NADH. Nach Passage der Mitochondrienmembran werden diese reduzierenden Äquivalente in die Atmungskette geschleust und dort zu Wasser verbrannt. Der Wasserstofftransport durch die Mitochondrienmembran erwies sich jedoch als ein Problem, als Lehninger entdeckte [1], daß isolierte Lebermitochondrien zugeführtes NADH nicht oxidieren können.

Diese offensichtliche Impermeabilität der Mitochondrienmembran für Pyridinnukleotide wurde auch für Mitochondrien anderer Gewebe nachgewiesen [2]. Da folglich der Wasserstoff nicht direkt über NADH in die Mitochondrien hinein transportiert werden kann, wurde von Bücher [3] postuliert, daß die reduzierenden Äquivalente in Form eines reduzierten Substrates in die Mitochondrien gelangen. Dabei dient ein oxydiertes Substrat als Akzeptor für cytosolischen Wasserstoff, das dann in reduzierter Form die Mitochondrienmembran passiert und nach Abgabe des Wasserstoffs in oxydierter Form wieder in das Cytozol zurückkehrt, wo es zur erneuten Aufnahme von reduzierenden Äquivalenten bereitsteht. Voraussetzung für solche sog. "Substratzyklen" ist: 1. oxydierte und reduzierte Substrate müssen die Mitochondrienmembran leicht permeieren können; 2. auf beiden Seiten der Membran müssen Dehydrogenasen vorhanden sein, die mit diesen Substratpaaren reagieren; 3. diese Dehydrogenasen müssen eine ausreichend hohe Aktivität haben.

1958 postulierten Bücher und Klingenberg [3,4] den α -Glycerophosphat-Zyklus und den Malat-Zyklus. Es folgten der Vorschlag eines Malat-Aspartat-Zyklus und eines Malat-Zitrat-Zyklus von Borst [5] und eines β -Hydroxybutyrat-Zyklus von Devlin und Bedell [6]. Von Whereat et al. wurde später noch ein Fettsäureverlängerungs-Zyklus [7,8] vorgeschlagen. Wegen der Lokalisation der beteiligten Enzyme und des günstigen Potentialgefälles [5,9] schien der α -Glycerophosphat-Zyklus nicht nur für den Wasserstofftransport im Insektenflugmuskel [4], sondern auch für den Transfer reduzierender Äquivalente in der Säugetierzelle prädestiniert zu sein. Es ergaben sich allerdings Schwierigkeiten hinsichtlich der geringen Aktivität der mitochondriellen α -Glycero-

phosphatdehydrogenase in Säugetiergeweben und ihrer geringen Affinität zum Substrat [10]. Andererseits würden zwar hohe Aktivitäten an Malatdehydrogenase auf beiden Seiten der Mitochondrienmembran einen Malat-Zyklus begünstigen, jedoch ist bekannt, daß das oxydierte Substrat, d.h. Oxaloacetat, die Membran nicht permeieren kann [11]. Borst umging diese Schwierigkeit, indem er eine Kopplung mit der Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase, die ebenfalls in hoher Aktivität sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien vorliegt, forderte [5]. Oxaloacetat würde deshalb als Aspartat in das Cytosol zurückkehren. Experimente mit rekonstruiertem Cytoplasma und isolierten Mitochondrien [12] zeigten, daß ein Malat-Aspartat-Zyklus möglich ist. Letztlich können aber nur Beobachtungen an intakten Zellen Hinweise darüber geben, wie Reaktionen in zwei zellulären Kompartimenten koordiniert sind. Das Problem des Wasserstofftransportes vom Cytosol in die Mitochondrien muß also an einem System von höherer Komplexität untersucht werden. Aus diesem Grunde wählten wir die perfundierte Leber als Untersuchungsobjekt.

Als Modelle für den Wasserstofftransport vom Cytosol in die Mitochondrien wurde (a) der Äthanol-Abbau und (b) der Glycerinstoffwechsel gewählt. Äthanol wird im Cytosol durch die Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd und durch die Aldehyddehydrogenase weiter zu Acetat abgebaut. Acetat ist das eigentliche Endprodukt des Äthanolabbaus in der Leber [13]. Wegen der geringen Aktivität der Acetat-Thiokinase [14] wird nur ein kleiner Teil des entstehenden Acetats zu Acetyl-CoA aktiviert; der größere Teil wird ausgeschieden und von anderen Organen metabolisiert. Die reduzierenden Äquivalente, die im Cytosol bei der Äthanoloxidation zu

Acetat in Form von NADH entstehen, müssen in der Atmungskette letztlich zu Wasser verbrannt werden. Ein Wasserstofftransport ist obligatorisch. Beim Glycerinstoffwechsel liegen ähnliche Bedingungen vor. Die Umwandlung von Glycerin zu Glucose oder Laktat ist mit der Bildung eines Überschusses von reduzierenden Äquivalenten verbunden, der ebenfalls durch mitochondrielle Oxidation beseitigt werden muß.

Die Beteiligung des Malat-Aspartat-Zyklus und des α -Glycerophosphat-Zyklus am Wasserstofftransport unter diesen Bedingungen sollte mit Hilfe von Hemmstoffen untersucht werden. Geeignete Hemmstoffe schienen uns Rotenon und Antimycin A, beides Hemmstoffe der Atmungskette [15-20], und der Transaminasenhemmstoff Aminooxyacetat [21-23] zu sein. Das Schema der möglichen Wasserstoffwege in Abbildung 1 zeigt die Angriffspunkte der drei Hemmstoffe. Bei intakten Mitochondrien blockiert Rotenon die Elektronenübertragung zwischen der NADH-Oxydase und den im Hauptfluß liegenden Flavoproteiden. Ein Wasserstofffluß zur Atmungskette über die flavinabhängigen α -Glycerophosphat- und Succinatdehydrogenasen sollte unter diesen Bedingungen noch möglich sein. Erst bei einer Blockade durch Antimycin A, das die Elektronenübertragung von Cytochrom b nach Cytochrom c_1 hemmt [20] und somit den Fluß von der Flavoproteid-Ubiquinon-Region der Atmungskette auf die Cytochrom-Region verhindert, wird der Fluß des gesamten Wasserstoffes durch die Atmungskette erfaßt. Aminooxyacetat (AOA), ein Derivat des Hydroxylamins, ist ein Inhibitor von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen [21-27]. Es sollte daher auch die Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase hemmen und somit in den Malat-Aspartat-Zyklus eingreifen.

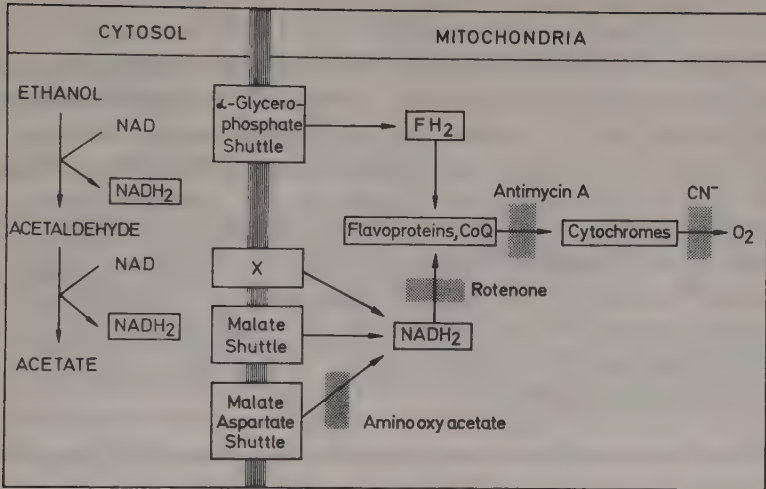


Abb. 1 Schematische Darstellung der Angriffspunkte von Amino oxyacetat, Rotenon und Antimycin A

2. Methodik

2.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion

Eine geeignete Methode für Stoffwechseluntersuchungen ist die Durchströmung isolierter, überlebender Organe. Das Kreislaufprinzip und die morphologische Organisation entsprechen bei einem solchen Perfusionsexperiment den Verhältnissen in vivo. Das isolierte Organ ist den Einflüssen des Gesamtorganismus entzogen und kann somit gezielten, reproduzierbaren Versuchsbedingungen unterworfen werden. Andererseits erlaubt diese Art von Präparation in stärkerem Maße Rückschlüsse auf physiologische Zustände als dies bei Untersuchungen an Gewebeschnitten, Homogenaten und Zellfraktionen möglich ist.

Perfusionen isolierter Rattenlebern wurden 1941 erstmals von Corey und Britten [28] und Trowell [29] durchgeführt. Die Methode wurde 1951 gleichzeitig von Brauer et al. [30] und Miller et al. [31] aufgegriffen. Während Miller als Perfusionsmedium heparinisiertes Rattenblut benutzte, verwendete Schimassek [32] später ein halbsynthetisches Medium (Salzlösung, Rinderalbumin und gewaschene Rindererythrocyten). Die Komplexität des Untersuchungsobjekts wurde von Scholz und Bücher [33,34] durch die Entwicklung der hämoglobinfreien Leberperfusion weiter eingeschränkt. Als Perfusionsmedium wurde eine Salzlösung mit Plasmaexpandern eingeführt. Durch Erhöhung der Durchströmungsgeschwindigkeit konnte, trotz Fehlens des Hämoglobins als Sauerstoffträger, eine ausreichende Versorgung der Leber allein mit physikalisch gelöstem Sauerstoff erreicht werden. Die Ausschaltung des Hämoglobins erlaubte die Anwendung der Platinelektrode zur exakten Messung des Sauerstoffverbrauchs der Leber und der fluorometrischen Registrierung von reduzierten Pyridinnucleotiden (NADH und NADPH) [35] und oxidierten Flavoproteiden von der Leberoberfläche [36], sowie

die Messung von Absorptionsspektren der Cytochrome [37, 38]. Über die Methode der hämoglobinfreien Leberperfusion und deren Modifizierung soll im folgenden ausführlich berichtet werden.

2.1.1. Perfusionsapparatur

Eine Leber kann mit rezirkulierendem und nicht rezirkulierenden Perfusat durchströmt werden. Man spricht dann vom geschlossenen bzw. offenen System. Das geschlossene System wird man anwenden, um durch die mehrmalige Leberpassage eine Akkumulation der zu analysierenden Substrate zu erreichen und damit geringe Konzentrationsunterschiede deutlicher werden zu lassen. Die Größe der Konzentrationsab- und -zunahmen ist abhängig von der Menge des zirkulierenden Volumens. Dagegen bewährt sich das offene System, wenn man arteriovenöse Differenzen von Metaboliten bestimmen will. Im Gegensatz zum geschlossenen System kann beim offenen System der Leber ständig Perfusat genau definierter Zusammensetzung angeboten werden.

Die von uns zunächst benützte Perfusionsapparatur ist eine Weiterentwicklung der von Scholz beschriebenen [34, 39]. Später erfuhr diese Apparatur grundlegende Änderungen sowohl in der Anordnung der Bauteile als auch in ihrer technischen Konzeption. Folgende Forderungen wurden an die neue Apparatur gestellt:

(1) Austauschbarkeit des Perfusionsmediums

Diese technische Möglichkeit sollte den Austausch des Perfusats während eines laufenden Experimentes erlauben. Die Vorteile des offenen und geschlossenen Systems sollten sich damit kombinieren lassen.

(2) Reduzierung des zirkulierenden Volumens

In den Abbildungen 2 und 3 sind beide Apparaturen schematisch dargestellt. Die ältere Apparatur (Abb. 2) besitzt

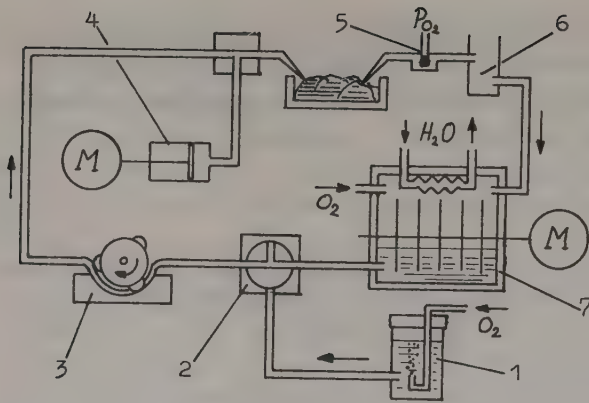


Abb. 2 Ältere Perfusionsapparatur mit Scheibenoxxygenator

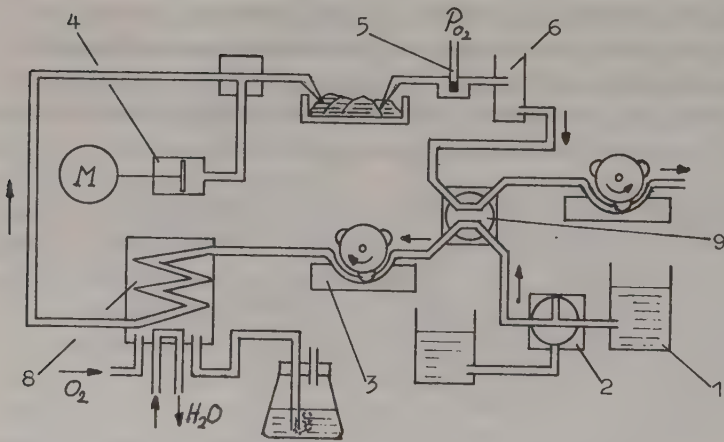


Abb. 3 Neue Perfusionsapparatur mit Diffusionsoxygenator
(1) Vorratstopf, (2) Dreiwegehahn, (3) Rollenpumpe, (4) Infusionspumpe mit Motor, (5) Sauerstoffelektrode, (6) Topf für Probenentnahmen, (7) Scheibenoxxygenator mit Motor, (8) Diffusionsoxygenator, (9) Vierwegehahn

einen temperierten Scheibenoxxygenator (Polypropylenwalze, 8 cm im Durchmesser, 30 cm lang, mit ca. 40 eingefrästen Scheiben), in dem das Medium mit dem Sauerstoff-CO₂-Gemisch aufgesättigt wird. Mit einer Rollenpumpe wird das Perfusat über die Vena portae in die Leber gepumpt. Es verläßt die Leber über die kanülierte Vena cava, wird an der Sauerstoffelektrode vorbei zu einem Sammelgefäß und von dort zurück zum Oxygenator geleitet. Aus dem Sammelgefäß können Proben zur Analyse entnommen werden. Um denaturiertes Eiweiß oder Luftbläschen vor der Leber abzufangen, ist ein Filtertopf vorgeschaltet. Während der Operation wird temperiertes und mit Sauerstoff angereichertes Medium aus einem Vorratstopf über einen Dreiweghahn bezogen.

Entscheidend für die neue Perfusionsapparatur war die Volumenreduzierung des zirkulierenden Perfusionsmediums. Hierfür wurde aber die Konstruktion eines neuen Oxygenators notwendig, der nicht wie die bisherigen Apparaturen auf ein großes Totvolumen (etwa 90 ml beim Scheibenoxxygenator) angewiesen ist. Der Diffusionsoxygenator erfüllte diese Forderung. Er besitzt an der Außenseite seines temperierten (37°) Aluminiumkerns zwei durch einen Silikonkautschuk-Schlauch getrennte Räume. Das Perfusionsmedium, das im Inneren des 9 m langen und 0.2 cm dicken, für Gase permeablen Schlauches den Oxygenator durchläuft, wird durch das im Gegenstrom aufsteigende Gasgemisch aufgesättigt.

Die Sättigung des Mediums hängt einmal von der Länge des Schlauches innerhalb des Oxygenators, zum anderen von der Flußgeschwindigkeit des Perfusates ab. Die Länge des Schlauchsystems gewährleistet bei den üblichen Perfusionsgeschwindigkeiten von 30 - 40 ml/min 99% Aufsättigung.

Das Perfusionssystem ist durch einen Dreiwegehahn an zwei Vorratsgefäße angeschlossen (Abb. 3). Von hier gelangt das Medium über einen Vierwegehahn zur Rollenpumpe, von wo es durch den Diffusionsoxygenator in die Leber gepumpt wird. Nach Passage der Sauerstoffelektrode und des Sammelgefäßes kann es entweder erneut in den Kreislauf geschickt werden (geschlossenes System mit der Möglichkeit, das Perfusat auszutauschen) oder bei anderer Stellung des Vierwegehahns mit einer weiteren Rollenpumpe abgesaugt werden (offenes System). Mit Hilfe von Infusionspumpen lassen sich genau definierte Mengen pro Zeiteinheit dem Perfusionsmedium beifügen.

2.1.2. Perfusionslösung

Die Perfusionslösung besteht aus einer Elektrolytlösung, wie sie von Krebs und Henseleit erstmals angegeben wurde (Tab. 1)[40]. Bei Experimenten im geschlossenen System enthält die Lösung als zusätzliche Puffersubstanz zweimal dialysiertes Rinderalbumin (4 g/100 ml). Die Notwendigkeit onkotisch wirksamer Substanzen ist zweifelhaft, da die beobachtete Leberschwellung bei Anwesenheit wie Abwesenheit von onkotisch wirksamen Substanzen nicht wesentlich differierte.

Die Perfusionslösungen werden mit 95% O₂ und 5% CO₂ gesättigt. Das Gasgemisch wird wasserdampfgesättigt in den Oxygenator geleitet. Durch den Bicarbonat-Puffer (25 mM HCO₃, 5 Vol% CO₂) ist der pH Wert auf 7.4.eingestellt.

Tabelle 1

NaCl	115 mM	MgCl ₂	1.18 mM
NaHCO ₃	25 mM	NaH ₂ PO ₄	1.24 mM
KCl	5.9 mM	CaCl ₂	2.50 mM
Na ₂ SO ₄	1.2 mM		

2.1.3. Volumenbestimmung

Wenn die Perfusionslösung während des Versuches ausgetauscht wird, müssen die Perfusionsvolumina bestimmt werden können. Dazu wurde die Radioisotopenverdünnungsmethode benutzt. Wir verwendeten bei unseren Versuchen Tritium-Wasser, um das Perfusionsvolumen und den löslichen Raum der Leber zu erfassen. Das Volumen ergibt sich entsprechend der folgenden Gleichung:

$$\text{Vol} = \frac{\text{Vol}_{\text{Standard}} \times \text{IpM}_{\text{Standard}}}{\text{IpM}_{\text{Probe}}}$$

2.1.4. Operationstechnik

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Wistar Ratten von 200 - 250 g aus der Tierzucht Dr. Thommae (Biberach). Die Tiere erhielten Altrumin Standardnahrung (Altrogge, Loge) und Wasser ad libitum. In einigen Experimenten wurde den Tieren das Futter 24 Std. vorher entzogen. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (5 mg/100 g) narkotisiert. Zu Beginn der Operation wird das Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet, anschließend der Magen frei präpariert, vom Oesophagus abgetrennt und zur Seite geklappt. Die Vena cava wird dicht oberhalb des Abgangs der Nierenvenen umschlungen. Um die Vena portae werden zwei lockere Ligaturen gelegt, wobei der am weitesten leberwärts gelegene Zufluß erfaßt werden muß. Nach Incision der Pfortader wird eine Polyäthylenkanüle bei langsam laufender Perfusionspumpe (10 - 15 ml/min) eingeschoben und eingebunden. Innerhalb von 2-3 sec. ist die Leber entblutet und zeigt ihre gelblich-braune Eigenfarbe. Nach Ligatur der Vena cava inf. wird der Thorax parasternal eröffnet. Durch das rechte Herzohr wird eine Kunststoffkanüle in die Vena cava bis

zur Einmündung der Lebervenen vorgeschoben und zusammen mit einem Zwerchfellzipfel eingebunden. Die Perfusionsgeschwindigkeit wird nun auf 25 - 30 ml/min gesteigert. Nach Präparation aus dem Situs wird die Leber in das vorbereitete Gefäß gehängt. Die gesamte Operation dauert 7-8 Minuten. Davon entfallen auf die Zeit vom Einführen der Pfortaderkanüle bis zum Einbinden der Cavakanüle ca. 2 Minuten. Nur während dieser Phase der Operation ist die Leber nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt.

2.1.5. Die isolierte Leber unter den Bedingungen der Perfusion

Die Leber in situ wird aus zwei Gefäßsystemen mit Blut versorgt. (Vena portae und Arteria hepatica), die sich am Anfangsteil oder innerhalb der kapillaren Endstrecke (Sinusoide) vereinigen und über ein gemeinsames System abgeleitet werden. Die A. hepatica, die an der Sauerstoffversorgung der Leber zu etwa 40% (nach Fischer et al. [41]) beteiligt ist, versorgt auf Grund der anatomischen Gegebenheiten keine eigenen Gefäßbezirke. Ihre Funktion ist lediglich, das venöse Pfortaderblut zu arterialisieren, bevor es in Sauerstoffaustausch mit den Leberzellen tritt. Durch die besondere Gefäßanordnung können die Leberzellen auch nach Ausschaltung der A. hepatica mit O₂ versorgt werden, wenn das über die Pfortader eintretende Blut, bzw. Perfusat, mit Sauerstoff gesättigt ist.

2.2. Sauerstoffmessung

Der im Perfusionsmedium physikalisch gelöste Sauerstoff wird amperometrisch mit einer Platinelektrode bestimmt, einer Modifizierung der von Clark erstmals 1953 [42] beschriebenen Meßanordnung. Die Elektrode besteht aus einer

Platinkathode und einer Ag/AgCl Anode, verbunden durch eine KCl-Lösung und vom Perfusionsmedium durch eine gasdurchlässige Teflonmembran getrennt. Beim Anlegen einer Spannung wird an der Platinoberfläche Sauerstoff reduziert. Der dabei entstehende Reduktionsstrom ist der Sauerstoffkonzentration proportional, wenn im Meßkreis eine Polarisationsspannung von 0.7 Volt angelegt ist.

Die Elektrode wird mit der Perfusionslösung, die mit Luft und definierten Gasgemischen gesättigt ist, geeicht. Die Atmungsgröße des isolierten Organs ist bei konstanter Durchströmungsgeschwindigkeit proportional der Differenz der Sauerstoffdrucke vor und hinter der Leber. Der 'arterielle' Wert wird in unserer Meßanordnung nicht kontinuierlich registriert; er wird vor und nach dem Perfusionsexperiment gemessen. Die Atmungsgröße wird aus der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz (AVD), der Durchströmungsgeschwindigkeit (D) und dem Feuchtgewicht (FG) nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Atmungsgröße} = \frac{\text{AVD} \cdot a \cdot 2 \cdot D}{760 \cdot M \cdot \text{FG}} \quad \mu\text{gAtome O/Std./g (FG)}$$

a = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient = 0.023 ml O₂
gelöst in 1 ml 0.9% NaCl bei 760 Torr, 37°C

M = Molvolumen = 25.5 · 10³ ml (bei 37°C)

2.3. Oberflächenfluorometrie

Die Fluoreszenz von reduzierten Pyridinnukleotiden und oxidierten Flavoproteiden kann von der Oberfläche einer hämoglobinfrei perfundierten Leber registriert werden. Änderungen der Fluoreszenzintensität spiegeln intrazelluläre Redoxänderungen wider. Nach Anregung mit Licht von 366 nm haben Lösungen von reduzierten Pyridinnukleotiden ein Fluoreszenzmaximum bei etwa 470 nm [43]. Die protein-

gebundenen, reduzierten Pyridinnukleotide in Mitochondrien und intakten Zellen haben dagegen ein Maximum zwischen 440 und 450 nm [36]. Die Intensität dieser blauen Fluoreszenzstrahlung ist abhängig vom Gewebsgehalt von NADH und NADPH [33,44]. Oxydierte Flavinnukleotide zeigen nach Anregung mit Licht von 436 nm eine gelbe Fluoreszenz [45], die allerdings bei den meisten der bisher isolierten Flavoproteiden nicht beobachtet wird [46]. In Suspensionen von isolierten Mitochondrien sind Fluoreszenzänderungen mit einem Maximum bei 570 nm eng mit Absorptionsänderungen von Flavoproteiden, insbesondere der Lipoamiddehydrogenase [47,48,49] korreliert. Es konnte nachgewiesen werden, daß die gelbe Fluoreszenz von der Oberfläche der perfundierten Leber ausschließlich durch mitochondriale Redoxänderungen ausgelöst werden [36]. Eine quantitative Korrelation von Gewebsgehalt oxidierter Flavoproteide und Fluoreszenzintensität steht jedoch noch aus.

Zur kontinuierlichen Messung beider Fluoreszenzintensitäten wurde ein Doppelfluorometer angewandt [50]. Aus dem Licht einer wassergekühlten Quecksilberdampfampe werden durch Glasfilter, die auf einer rotierenden Scheibe angebracht sind, Wellenlängen von 366 und 436 nm ausgefiltert. Die Primärstrahlung regt in der Leberoberfläche bis in die Tiefe von 1-2 mm die Fluoreszenzstrahlung mit Maximum bei 440-450 nm (PN) und 550-580 nm (FP) an, die nach Passieren von ebenfalls auf der rotierenden Scheibe angebrachten Sekundärfiltern (450 bzw. 570 nm) auf einen Photomultiplier geleitet werden. Von einem zweiten Photomultiplier wird die Primärstrahlung registriert, wodurch Schwankungen in der Lichtstärke der Quecksilberdampfampe kompensiert werden können. Durch die Anordnung der zwei Glasfilterpaare auf der rotierenden Scheibe wird jeweils die Primär- und Sekundärstrahlung nur einer Wellenlänge

(Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung der Pyridin- bzw. Flavinnukleotide) gemessen.

Eine quantitative Messung kann mit der Fluorometrie nicht erreicht werden, da bei der Vielfalt der Faktoren, die die Intensität der Fluoreszenzstrahlung beeinflussen, eine Eichung zur Zeit nicht möglich ist. Um dennoch eine Vorstellung von der Größe der Redoxänderungen zu bekommen, vergleichen wir die Fluoreszenzänderungen mit denen, die durch Anoxie verursacht werden.

2.4. Metabolitbestimmung

Perfusatproben wurden aus dem Auffanggefäß hinter der Leber entnommen. Zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Substrate wurde 1 ml Perfusat mit 2 M HClO_4 enteiweißt und mit 1.65 M K_2CO_3 /TRA-Puffer neutralisiert. Bei Versuchen mit Krebs-Henseleit-Lösung als Perfusionsmedium konnte auf eine Enteiweißung völlig verzichtet werden. Die Proben wurden entweder in mit Testgemisch vorbereitete Reaktionsgefäße gegeben oder mit einem automatischen Proben-Reagenzdosierer (Eppendorf) direkt aus dem Auffanggefäß entnommen.

Zur Gewebsextraktion wurde die Leber mit flüssigen Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Gewebe bei -25° im Mörser zerrieben. Nach Wägung wurde es in einem Äthanol-Perchlorsäure-Extraktionsmedium mit Ultraschall homogenisiert und mit KOH auf pH 6-7 neutralisiert. Der Überstand wurde zur enzymatischen Messung verwandt.

Die enzymatische Bestimmung der Metabolite erfolgte nach der Methode des optischen Testes von O. Warburg [51]. NADH und NADPH absorbieren Licht im nahen Ultraviolett (Maximum bei 340 nm), ihre oxidierten Partner dagegen nicht. Änderungen der Konzentration von NADH und NADPH während

eines Reaktionsablaufes können aus der gemessenen Extinktion berechnet werden. Im einfachen optischen Test sind an der Meßreaktion Pyridinnukleotide direkt, im zusammengesetzten optischen Test sind sie indirekt über eine NAD-abhängige Indikatorreaktion beteiligt. Aus der Extinktionsdifferenz läßt sich die Menge der zu messenden Substanz berechnen, sofern die Gleichgewichtskonstante die Endprodukte einer Seite stark begünstigt (z.B. bei der Pyruvatbestimmung). Bei ungünstiger Lage des Gleichgewichtes kann durch Zugabe von Reagenzien, die das Endprodukt laufend aus dem Gleichgewicht entfernen, ein quantitativer Umsatz erreicht werden (z.B. bei der Laktatbestimmung).

Im einzelnen wurden folgende Metabolite enzymatisch bestimmt: Laktat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Glycerin, α -Glycerophosphat, Glucose, Äthanol, Ammoniak und Harnstoff (für methodische Details siehe [52]). Zur enzymatischen Messung benutzten wir ausschließlich Enzyme und Coenzyme der Firma Boehringer.

2.5. Die perfundierte Leber als ein Modell

Der Arbeitskreis, in dem die vorliegende Dissertation entstand, ist seit 10 Jahren bemüht, das System der Leberperfusion zu vereinfachen und zu standardisieren und dadurch die Komplexität des Untersuchungsobjektes einzuschränken. Eine fortschreitende Einschränkung der Komplexität bedeutet aber eine zunehmende Entfernung des untersuchten Objektes von den physiologischen Verhältnissen. Die perfundierte Leber wird dadurch zu einem "Modell". Ergebnisse, die an diesem "Modell" gewonnen werden, können deswegen nicht ohne weiteres auf die Leber in situ übertragen werden. Die Intaktheit der zellulären Organisation sowie die erhalten gebliebene Fähigkeit zur Syn-

these komplizierter Verbindungen (z.B. Glucose, Ketonkörper, Harnstoff, siehe Abb. 4,7 und Tab. 2) machen dieses Lebermodell aber geeignet für die Untersuchung zellulärer Koordinationen, z.B. die Koordination verschiedener Zellorganellen beim Transport von reduzierenden Äquivalenten.

3. Ergebnisse

3.1. Stoffwechselwirkungen von Aminoxyacetat

Aminoxyacetat (AOA), ein acetyliertes Derivat des Hydroxylamins, bindet Pyridoxal und ist bekannt als Hemmstoff für pyridoxalphosphathaltige Enzyme [21-27]. Da keine Spezifität dieses Hemmstoffes gegenüber bestimmten pyridoxalphosphathaltigen Enzymen nachgewiesen ist, sind vielfältige Stoffwechselwirkungen zu erwarten. Eine Hemmung der Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase und damit des intrazellulären Wasserstofftransportes über den postulierten Malat-Aspartat-Zyklus wird deshalb mit anderen Effekten vergesellschaftet sein. Es mußte deshalb zunächst geklärt werden, in welchem Ausmaße der energielieferende Stoffwechsel, insbesondere der Aminosäurenkatabolismus, durch den Hemmstoff beeinflusst wird.

3.1.1. Sauerstoffaufnahme

Unter allen Versuchsbedingungen hatte die Zugabe von AOA eine verminderte Sauerstoffaufnahme zur Folge (Abb. 4,5,6 8-10, Tab. 2). In Abwesenheit von exogenen Substraten betrug die Abnahme der Atmungsgröße 10% des Gesamtsauerstoffverbrauches, d.i. 20-30 $\mu\text{gAtome/g} \times \text{h}$; das Maximum des Abfalles war bereits nach 10 Minuten erreicht. Dieser Effekt war reversibel, wenn z.B. bei Experimenten mit nicht rezirkulierendem Perfusat die Infusion von AOA sistierte (Abb. 4 und 6). Nach Zugabe von exogenen Substraten (z.B. Pyruvat, Laktat, Octanoat oder Äthanol) wird gewöhnlich eine Zunahme des Sauerstoffverbrauches beobachtet. In Anwesenheit von AOA wurde eine Atmungssteigerung nur nach Pyruvat oder Octanoat gesehen, während die Atmungssteigerung nach Laktat oder Äthanol durch AOA unterdrückt wurde (Abb. 6 und 8).

3.1.2. Glykogenabbau und Glycolyse

Lebern gefütterter Ratten schütten bei extrakorporaler Perfusion Glucose, Laktat und Pyruvat aus, bis ein konstanter Spiegel dieser Substrate im Perfusat erreicht ist. Dabei werden die Glykogenvorräte mobilisiert. Die Endkonzentrationen, die bei Perfusion mit rezirkulierendem Medium nach ca. 60 Minuten erreicht werden, liegen im Bereich von 10 mM Glucose, 2 mM Laktat und 0.2 mM Pyruvat. Offensichtlich bewirkt ein großer Konzentrationsgradient dieser Metabolite vom intra- zum extrazellulären Raum eine gesteigerte Glykogenolyse mit nachfolgender Glycolyse. Steigende Perfusatkonzentrationen führen dann allmählich zu einer Verlangsamung des Kohlenhydratabbaus (Tab. 2). Bei Perfusion mit nicht rezirkulierendem Medium bleibt der hohe Konzentrationsgradient bestehen und entsprechend werden auch konstant hohe Glykogenolyse- und Glycolysegeschwindigkeiten gemessen (Abb. 4).

Unter dem Einfluß von AOA war die Laktatproduktion gesteigert (Tab. 2, Abb. 4). Die Konzentration an Pyruvat (maximal 0.2 mM im geschlossenen System) fiel innerhalb der ersten 10 Minuten nach Zugabe von AOA auf Werte an der Grenze der Nachweisbarkeit. Die Glucoseproduktion wurde dagegen durch AOA nicht beeinflusst (Abb. 4).

3.1.3. Gluconeogenese

Lebern von Ratten, denen 24 Stunden die Nahrung entzogen wurde, produzierten bei Perfusion in Abwesenheit von exogenen Substraten Glucose und Harnstoff mit Geschwindigkeiten von ungefähr 6 und 9 $\mu\text{Molen/g} \times \text{h}$. Die Zugabe von AOA verminderte die Glucose- und Harnstoffbildung (Abb. 5). Dies läßt vermuten, daß die Glucoseausschüttung nicht durch den Abbau von Restglykogen, sondern durch Gluconeogenese

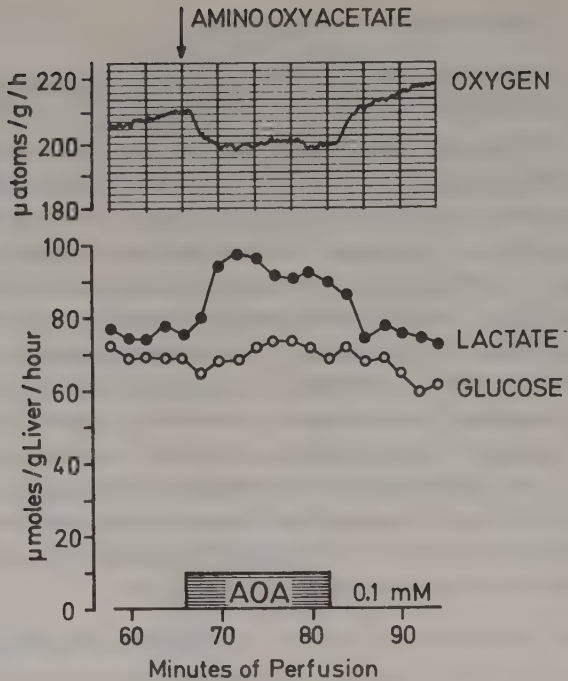


Abb. 4 Auswirkungen von AOA auf Glucose- und Laktatproduktion
Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit nicht rezirkulierendem Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer ohne exogene Substrate perfundiert. Die Geschwindigkeiten der Sauerstoffaufnahme (oben), sowie der Laktat- und Glucoseproduktion wurden aus den arteriovenösen Differenzen und der konstanten Flußgeschwindigkeit berechnet. Die Infusion von 0.1 mM AOA bewirkte eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches um 7% und eine Zunahme der Laktatproduktion um etwa 20%. Die Glucoseausschüttung wurde dagegen nicht beeinflusst. Nach Beendigung der AOA-Infusion gingen Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion auf die Ausgangswerte zurück.

Zeitintervall (min)	AOA (0.3 mM)						
	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	
Laktat ($\mu\text{mole/g}\cdot\text{h}$)	21.3 ± 4.6	16.3 ± 6.0	7.0 ± 6.1	15.4 ± 5.3	14.8 ± 3.7	16.4 ± 3.8	
Pyruvat ($\mu\text{mole/g}\cdot\text{h}$)	1.8 ± 0.7	1.8 ± 0.9	0.4 ± 1.2	-16.4 ± 1.7	-0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.2	
Lakt. + Pyr. ($\mu\text{mole/g}\cdot\text{h}$)	23.1	18.1	7.4	-1.0	14.3	17.0	
Harnstoff ($\mu\text{mole/g}\cdot\text{h}$)	5.6 ± 0.5	6.2 ± 0.7	8.0 ± 1.0	4.3 ± 0.8	3.7 ± 0.6	3.9 ± 0.4	
Ketonkörper ($\mu\text{mole/g}\cdot\text{h}$)	3.1 ± 0.6	2.9 ± 0.9	2.3 ± 0.7	1.8 ± 0.6	0.5 ± 0.5	1.8 ± 0.4	
Zeit (min)		50	60	65	70	80	90
Sauerstoff (%)		100 ± 0.6	100	94 ± 1.3	90 ± 1.2	88 ± 1.4	89 ± 1.4
Laktat Pyruvat		6.9 ± 0.6	7.5 ± 1.1	54 ± 16	89 ± 17	102 ± 26	78 ± 19
β -Hydroxybut. Acetoacetat		0.70 ± 0.10	0.71 ± 0.08	0.64 ± 0.08	0.48 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.28 ± 0.05

Tab. 2 Auswirkungen von AOA auf den Leberstoffwechsel von gefütterten Tieren

Die Lebern von gefütterten Ratten wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. AOA wurde 60 Minuten nach Perfusionsbeginn zugegeben. Die Konzentrationen von Laktat, Pyruvat, Harnstoff, β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat wurden aus Perfusatproben bestimmt, die alle 5-10 Minuten entnommen wurden. Die Geschwindigkeiten der Sauerstoffaufnahme wurden berechnet wie in Abb. 4. Die Produktionsgeschwindigkeiten von Laktat, Pyruvat, Harnstoff und Ketonkörpern (d.i. Acetoacetat + β -Hydroxybutyrat) wurden aus den Konzentrationsdifferenzen von 10 Minuten berechnet und als $\mu\text{Mole/g Leber (feucht)} \times \text{Stunde}$ angegeben. Der Sauerstoffverbrauch wurde in Prozent des 60 Minuten-Wertes, der im Mittel $321 \pm 21 \mu\text{g Atome Sauerstoff/g Leber (feucht)} \times \text{Stunde}$ betrug, angegeben.

genese aus endogenen Aminosäuren bedingt war. Andererseits führten exogene Aminosäuren, wie z.B. Alanin (Abb. 6), zu einer markanten Stimulation der Glucoseproduktion. Auch unter diesen Bedingungen konnte die Geschwindigkeit der Glucosesynthese durch AOA vermindert werden; mit Alanin als Substrat fiel sie auf 10% des Ausgangswertes (Abb. 6). Die Gluconeogenese aus endogenen sowie aus exogenen Aminosäuren reagierte damit äußerst empfindlich auf den Transaminasenhemmstoff.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren sind die Substratpaare Laktat-Pyruvat und Glycerin-Dihydroxyaceton glucoplastische Substanzen, die zunächst ohne Transaminierung den Stoffwechselweg der Gluconeogenese erreichen. Laktat und Glycerin unterscheiden sich von Pyruvat und Dihydroxyaceton in ihrem Reduktionsgrad. Sie liefern je ein Paar reduzierende Äquivalente mehr als ihre oxidierten Partner. In Anwesenheit von AOA war die Gluconeogenese aus Laktat und Glycerin gehemmt, während diejenige aus Pyruvat und Dihydroxyaceton kaum beeinflusst wurde (Abb. 5 und 7). Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß der Unterschied im Reduktionsgrad der Substrate, bzw. die vermehrte Freisetzung von Reduktionsäquivalenten bei Laktat und Glycerin für den Hemmeffekt verantwortlich ist. Bei einem Vergleich der Versuchsergebnisse fiel weiter auf, daß es Unterschiede in dem Ausmaß der AOA-Hemmung bei den beiden Substraten Laktat und Glycerin gab. In Anwesenheit von AOA konnte Laktat die Glucoseproduktion nicht stimulieren (Abb. 5); andererseits konnte die Gluconeogenese aus Glycerin nur zu 50% gehemmt werden (Abb. 7).

Ähnlich wie Glycerin ist Xylitol ein glucoplastischer Polyalkohol, der den Stoffwechselweg der Gluconeogenese nicht auf der Stufe des Pyruvats betritt und der bei seiner Umwandlung in Glucose im Überschuß Reduktionsäquivalente liefert. Die Gluconeogenese aus Xylitol wurde ebenfalls zu 50% von AOA gehemmt (Abb. 9).

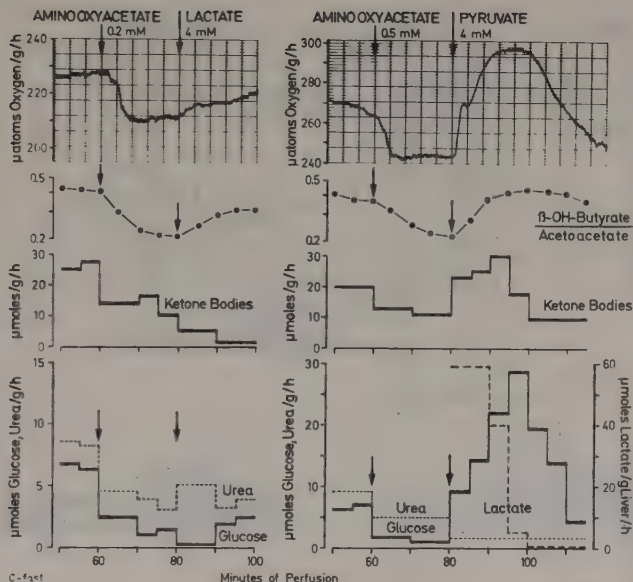


Abb. 5 Stoffwechselwirkungen von AOA bei perfundierten Lebern gehungerter Ratten; Wirkungen von Laktat und Pyruvat in Anwesenheit von AOA

Die Lebern von Ratten im Hungerzustand (24 Std. Nahrungs-entzug) wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme wurden wie in Abb. 4, die Produktionsgeschwindigkeiten von Glucose, Harnstoff und Ketonkörpern wie in der Legende zu Tab. 2 beschrieben, berechnet. AOA (0.2 bzw. 0.5 mM) wurde 60 Minuten nach Perfusionsbeginn, Laktat und Pyruvat (jeweils 4 mM) 20 Minuten danach zugegeben. In Abwesenheit des Inhibitors und exogener Substrate produzierten die Lebern Ketonkörper (20-30 $\mu\text{Mol/g}\cdot\text{h}$) sowie Glucose und Harnstoff (6 bzw. 9 $\mu\text{Mol/g}\cdot\text{h}$). AOA verminderte Sauerstoffaufnahme, Ketogenese, Glucose- und Harnstoffsynthese. Die anschließende Zugabe von Laktat (links) brachte keine Änderung dieser Parameter mit Ausnahme einer kleinen Zunahme der B/A Quotienten. Das zugegebene Laktat verschwand aus dem Perfusat in minimalen Raten (5 $\mu\text{Mol/g}\cdot\text{h}$). Die Zugabe von Pyruvat (rechts) stimulierte dagegen Sauerstoffaufnahme, Ketogenese und Gluconeogenese. Diese Stimulation dauerte nur solange an, bis das zirkulierende Pyruvat metabolisiert war. Innerhalb eines 30 minütigen Zeitraumes wurden pro Gramm Leber 42 μMol Pyruvat verbraucht. Daraus entstanden 9 μMol Glucose und 14 μMol Laktat bei einem Sauerstoffmehrerverbrauch von 21 $\mu\text{gAtomen}$.

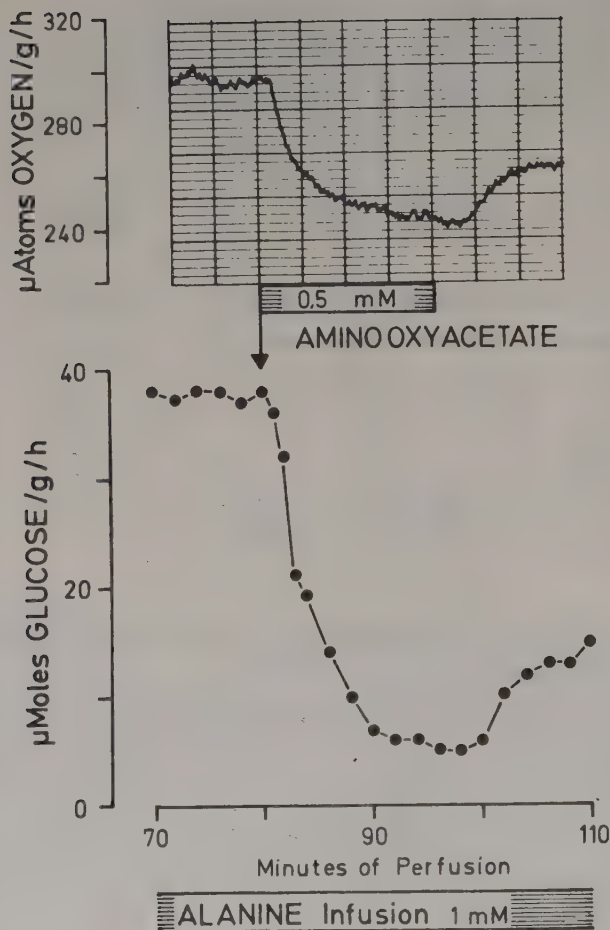
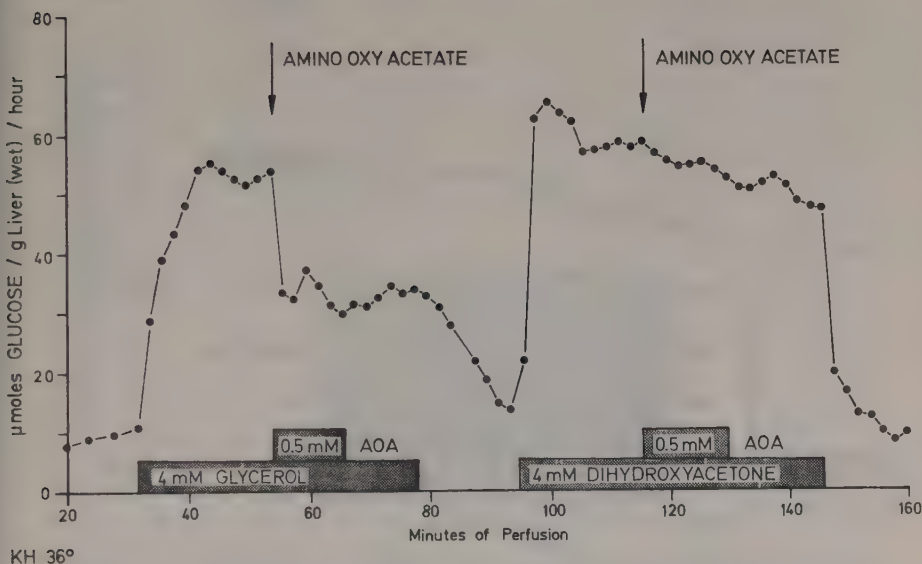


Abb. 6 Wirkungen von AOA auf die Gluconeogenese aus Alanin Die Leber einer Ratte im Hungerzustand (24 Std. Nahrungs- entzug) wurde mit nicht rezirkulierendem Krebs-Henseleit- Bikarbonat-Puffer mit 1 mM Alanin perfundiert. Die Geschwin- digkeiten der Sauerstoffaufnahme und der Glucoseproduktion wurden wie in Abb. 4 berechnet. Nach Infusion von 0.5 mM AOA nahmen die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme und der Glucoseproduktion um 20 bzw. 90% ab. Auch die Harnstoff- produktion war vermindert, wogegen die Bildung von Ammoniak

GLUCONEOGENESIS FROM GLYCEROL AND DIHYDROXYACETONE



KH 36°

Abb. 7 Wirkungen von AOA auf die Gluconeogenese aus Glycerin und Dihydroxyaceton

Die Leber einer Ratte im Hungerzustand (24 Std. Nahrungsentzug) wurde mit nicht rezirkulierendem Medium perfundiert. Die Geschwindigkeiten der Glucoseproduktion wurden wie in Abb. 4 berechnet. Glycerin und Dihydroxyaceton wurden mit einer Endkonzentration von 4 mM infundiert. Die Glucoseproduktion aus Glycerin wurde durch AOA um etwa 50% gehemmt, während diejenige aus Dihydroxyaceton unbeeinflusst blieb. Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn beide Substrate in umgekehrter Reihenfolge infundiert wurden.

Fortsetzung der Legende zu Abb. 6

nicht beeinflusst wurde (nicht abgebildet). Nach Absetzen der AOA-Infusion waren die Effekte teilweise reversibel.

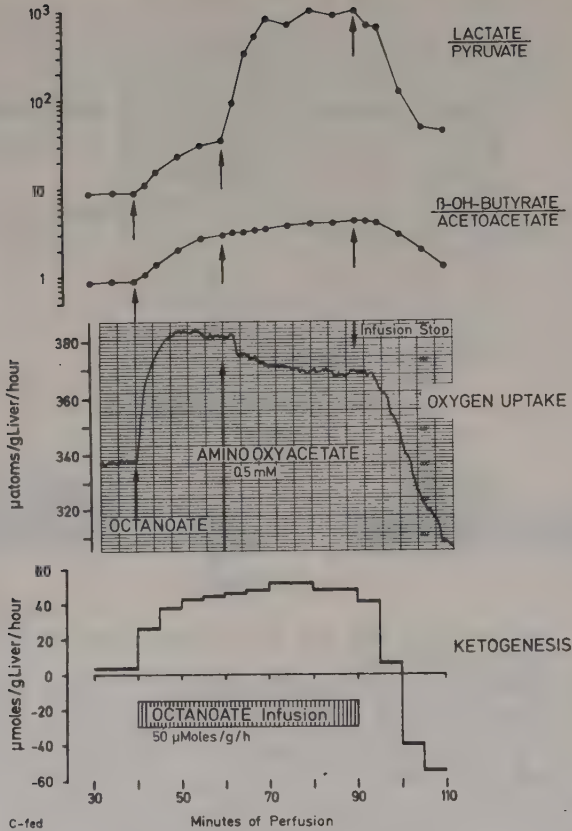


Abb. 8 Änderungen von Stoffwechselfparametern nach AOA in Anwesenheit von Octanoat
 Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Sauerstoffaufnahme und die Konzentrationen der Parameter wie Laktat, Pyruvat, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat wurden bestimmt, wie in der Legende zu Tab. 2 beschrieben. Na-Octanoat wurde mit einer Geschwindigkeit von 50 μ Mol/g $\times$ h infundiert, AOA (0.5 mM) wurde 20 Minuten nach Infusionsbeginn von Octanoat zugegeben. Nach Infusionsbeginn wurden Ketonkörper mit einer Geschwindigkeit von mehr als 40 μ Mol/g $\times$ h produziert, begleitet von einer Zunahme in der Sauerstoffaufnahme von 45 μ gAtomen/g $\times$ h. Somit

GLUCONEOGENESIS FROM XYLITOL, Inhibition by AMINO OXYACETATE

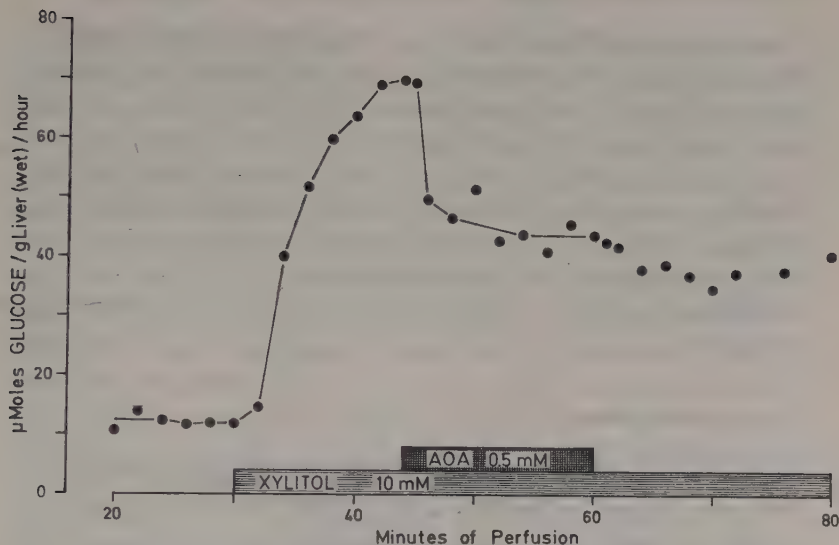


Abb. 9 Wirkungen von AOA auf die Gluconeogenese aus Xylitol

Das Experiment wurde in ähnlicher Weise wie das in Abb. 7 durchgeführt. Die Endkonzentrationen von Xylitol und AOA im Perfusat waren 10 bzw. 0.5 mM.

Fortsetzung der Legende zu Abb. 8

wurden etwa 50% der infundierten Fettsäure als Ketonkörper wiedergefunden. Außerdem fand sich ein Anstieg der L/P- und B/A-Quotienten. Die Zugabe von AOA verursachte einen weiteren Anstieg der L/P Quotienten, hatte jedoch keinen Einfluß auf die B/A Quotienten. Unter diesen Bedingungen war die Ketogenese nicht beeinträchtigt (siehe auch Abb. 5). Die Sauerstoffaufnahme dagegen zeigte eine Abnahme um 15 $\mu\text{gAtome/gxh}$. Nach Infusionsstop nahmen die Redoxquotienten sowie der erhöhte Sauerstoffverbrauch und die Ketogenese ab. Daraus kann geschlossen werden, daß die infundierte Fettsäure nicht akkumuliert wurde. Anschließend war eine Aufnahme der abgegebenen Ketonkörper zu beobachten, die nicht durch Zerfall von Ketonkörpern erklärt werden kann.

3.1.4. Harnstoffsynthese

Harnstoff, ein Endprodukt des Aminosäuren-Katabolismus, wurde von der perfundierten Leber gefütterter und gehungter Tiere in Geschwindigkeiten von etwa 7 bzw. 9 $\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$ synthetisiert. AOA hemmte die Ausschüttung von Harnstoff zu 50% (Tab. 2, Abb. 5). Die Hemmung konnte durch Pyruvat, d.h. ein Substrat, das in Anwesenheit von AOA metabolisiert wird, nicht rückgängig gemacht werden, so daß eine Hemmung der Harnstoffsynthese auf Grund von Substratmangel im energielieferenden Stoffwechsel unwahrscheinlich ist.

3.1.5. Ketogenese

In Abwesenheit von exogenen Substraten produzierte die Leber von Tieren im Zustand des Hungers mit hoher Geschwindigkeit Ketonkörper (d.h. β -Hydroxybutyrat + Acetoacetat; 20-30 $\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$). Diese Produktionsgeschwindigkeit blieb während einer Perfusionsdauer von mindestens 2 Stunden konstant, wenn keine Substrate oder Hemmstoffe zugegeben wurden. In Anwesenheit von AOA war die Ketogenese um 40-50% vermindert. Zugabe von Lactat hatte keinen Einfluß; Pyruvat hingegen war fähig, diesen AOA-Effekt aufzuheben - allerdings nur so lange, bis das im Perfusat zirkulierende Pyruvat metabolisiert war (Abb. 5).

Die Ketogenese von Lebern gefütterter Tiere war sehr klein, und eine signifikante Änderung nach Zugabe von AOA konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. 2). Nach Infusion von Fettsäure (z.b. Octanoat, Abb. 8) setzte eine Ketogenese mit hoher Geschwindigkeit (50 $\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$) ein, die durch AOA nicht vermindert werden konnte.

3.2. Änderungen im Redoxzustand der Leber

Der Redoxzustand der Leber, bzw. der Redoxsysteme in den einzelnen Kompartimenten ist ein wichtiger Parameter für die Untersuchung zellulärer Funktionen und Koordinationen. Darüberhinaus ist er ein empfindlicher Indikator für den intrazellulären Wasserstofftransport. Die Fluoreszenz von reduzierten Pyridinnukleotiden und oxidierten Flavoproteiden, die von der Oberfläche einer hämoglobinfrei perfundierten Leber registriert werden kann [36], sowie Metabolitpaare im Perfusat [3,53] sind wertvolle Indikatoren von intrazellulären Redoxänderungen. Die Pyridinnukleotidfluoreszenz reflektiert den Gehalt von NADH und NADPH im Cytosol und in den Mitochondrien [36,53,54]. Die Flavinfluoreszenz ist dagegen bedingt durch mitochondrielle Flavoproteide, insbesondere der Lipoamiddehydrogenase [36,49]. Im Gegensatz zur Fluoreszenzregistrierung spiegeln die Quotienten der Perfusatkonzentrationen von Laktat zu Pyruvat und β -Hydroxybutyrat zu Acetoacetat die Redoxpotentiale intrazellulärer NADH/NAD-Systeme wider. Der Quotient Laktat/Pyruvat (L/P) entspricht in erster Näherung dem Redoxpotential des cytoplasmatischen NADH/NAD-Systems, während der Quotient β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat (B/A) ein mitochondrielles Redoxpotential wiedergibt [3,53]. Da die Beziehung zwischen den Substratpaaren und den entsprechenden zellulären NADH/NAD-Systemen logarithmisch ist (d.h. das Redoxpotential: $E' = E'_0 - 30.7 \log \text{Red/Ox}$), wurden die Quotienten im logarithmischen Maßstab aufgetragen (Abb. 5, 8, 10, 11). Auf eine Umrechnung der Quotienten in Redoxpotentialeinheiten (mVolt) wurde verzichtet, da die Mittelpotentiale (d.i. E'_0) der intrazellulären Redoxsysteme unsicher sind.

3.2.1. Redoxquotienten im Perfusat

Nach Zugabe von AOA zu substratfrei perfundierten Lebern gefütterter Tiere war ein schneller Zuwachs der L/P-Quotienten und eine langsamere Abnahme der B/A-Quotienten zu beobachten. (Tab. 2, Abb. 10). Ein neues Niveau, entsprechend einem neuen Redoxpotential, war nach 10 bzw. 30 Minuten erreicht, wobei das cytoplasmatische NADH/NAD-System mehr reduziert, das mitochondrielle dagegen oxidiert erscheint. Eine darauf folgende Zugabe von Pyruvat (Abb. 10, rechts) verursachte einen Zuwachs der B/A-Quotienten, wogegen die Zugabe von Laktat auf die B/A-Quotienten keinen Einfluß hatte (Abb. 10, links). Die L/P-Quotienten verhielten sich indifferent nach Zugabe von Pyruvat und Laktat, wenn man von der Auslenkung unmittelbar nach Zugabe des Pyruvats absieht. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Lebern von gehungerten Tieren erzielt (Abb. 5).

Abbildung 11 gibt eine Zusammenfassung der Redoxänderungen nach Zugabe von AOA, wie sie unter vier verschiedenen metabolischen Zuständen der Leber beobachtet wurden: (a) Infusion von Äthanol, das bedeutet Produktion von reduzierenden Äquivalenten durch Alkohol- und Azetaldehyddehydrogenase im Cytosol; (b) Infusion von Laktat mit Bildung von cytoplasmatischen Wasserstoff und Pyruvat; (c) Infusion von Pyruvat, einem Substrat, das ohne weitere Reaktionsschritte der mitochondriellen Oxidation zur Verfügung steht; (d) Infusion von Octanoat, das bedeutet Bildung von mitochondriellem Wasserstoff bei der Fettsäure-Oxidation. Alle Substrate verursachten einen mehr oder weniger starken Anstieg der B/A-Quotienten und, mit Ausnahme des Pyruvats, einen Anstieg der L/P-Quotienten. Nach Zugabe von AOA zeigte sich eine Abnahme der B/A-Quotienten, wenn Substrate anwesend waren, die im Cytoplasma oxidiert werden (Äthanol, Laktat). Dagegen blieben die B/A-Quotienten nach AOA unverändert in Anwesenheit von Substraten, die intramitochondriell oxi-

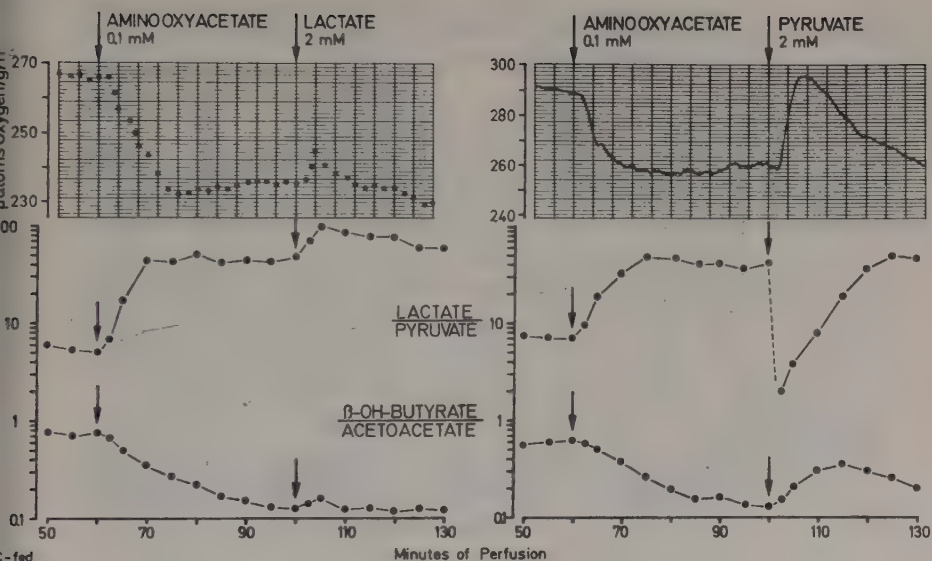


Abb. 10 Wirkungen von AOA auf den Redoxzustand der perfundierten Leber; Effekte von Laktat und Pyruvat in Anwesenheit von AOA

Die Lebern von gefütterten Ratten wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Konzentrationen von Laktat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat wurden aus Perfusatproben bestimmt, die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme wurde wie in Abb. 4 berechnet. Zugaben: AOA (0.1 mM) nach 60 Minuten, Laktat oder Pyruvat (jeweils 2 mM) nach 100 Minuten. AOA bewirkte eine Abnahme im Sauerstoffverbrauch um 30 μ gAtome und Änderungen im Redoxstatus (d.i. schneller Zuwachs der L/P-Quotienten sowie langsamer Abfall der B/A-Quotienten). Die Zugabe von Laktat hatte nur minimale Änderungen in der Sauerstoffaufnahme und den Redoxquotienten zur Folge. Das Laktat verschwand langsam aus dem Perfusat (6 μ Mol/g x h). Die Sauerstoffaufnahme wurde dagegen durch Pyruvat stimuliert, außerdem war ein markanter Anstieg der B/A-Quotienten zu beobachten. Der plötzliche Abfall der L/P-Quotienten ist Ausdruck des noch nicht eingestellten Gleichgewichtes, bedingt durch das zugegebene Pyruvat. Innerhalb eines 30 minütigen Zeitintervalles wurden pro Gramm Leber

CHANGES OF REDOX RATIOS IN PERFUSATE FOLLOWING AMINOXYACETATE

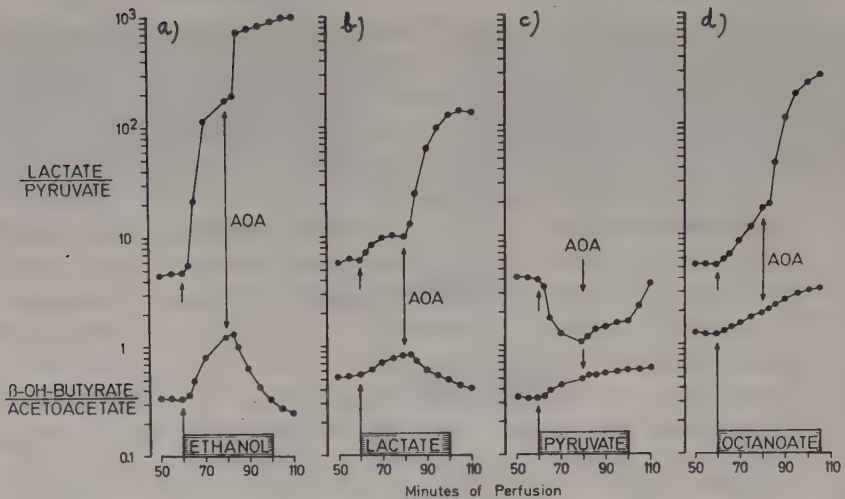


Abb. 11 Änderungen im Redoxzustand nach Zugabe von AOA unter verschiedenen metabolischen Bedingungen
Die Lebern gefütterter Ratten wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Konzentrationen von Laktat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat wurden aus Perfusatproben bestimmt. In vier verschiedenen Experimenten wurden die folgenden Substrate nach 60-minütiger Perfusion infundiert: (a) Äthanol (Infusionsrate $140 \mu\text{Mol/g} \times \text{h}$; anfängliche Perfusatkonzentration 0.5 mM); (b) Laktat ($170 \mu\text{Mol/g} \times \text{h}$, 0.6 mM); (c) Pyruvat ($210 \mu\text{Mol/g} \times \text{h}$, 0.6 mM); (d) Octanoat ($50 \mu\text{Mol/g} \times \text{h}$, 0.2 mM). Nach 80 Minuten Perfusionsdauer wurde dem Perfusat AOA (0.1 mM) zugegeben.

Fortsetzung der Legende zu Abb. 10

$28 \mu\text{Mol}$ Pyruvat metabolisiert, wobei $12 \mu\text{Mol}$ Laktat entstanden bei einem Mehrverbrauch von $12 \mu\text{gAtomen}$ Sauerstoff.

diert werden (Pyruvat, Octanoat). AOA bewirkte unter allen Bedingungen eine Zunahme der L/P-Quotienten.

3.2.2. Oberflächenfluoreszenz

Im Gegensatz zur Messung von Redoxpartnern, mit deren Hilfe eine Aussage über Änderungen der Redoxpotentiale gewonnen werden kann, zeigt die Oberflächenfluorometrie Änderungen im Gehalt an reduzierten Pyridinnukleotiden, bzw. oxidierten Flavoproteiden. Wenn man die Ergebnisse beider Methoden vergleicht, so muß man sich darüber klar werden, daß dies nur hinsichtlich der Richtung, nicht aber hinsichtlich des Ausmaßes der Änderung möglich ist. Eine Schwierigkeit bei der Interpretation der Pyridinnukleotidfluoreszenz ergibt sich aus dem Summationseffekt. Änderungen der Fluoreszenzintensität resultieren aus den Redoxänderungen im Cytosol und in den Mitochondrien. Bei der Interpretation der Flavoproteid-Fluoreszenz ist dieses Problem zu vernachlässigen, da die fluoreszierenden Flavoproteide vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert sind [36]. Die Flavinfluoreszenz ist deshalb neben den B/A-Quotienten im Perfusat ein Indikator für mitochondrielle Redoxänderungen. Flavinfluoreszenz und B/A-Quotienten reflektieren jedoch verschiedene Redoxsysteme, die nicht unbedingt im Gleichgewicht stehen müssen und unterschiedlich beeinflußt werden können. Während die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase das Gleichgewicht zwischen β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat und dem NAD/NADH-System der Mitochondrien einstellt, sind die fluoreszierenden, flavinhaltigen Dehydrogenasen wahrscheinlich Bestandteil der Atmungskette und von deren Funktionszustand abhängig. Ein Beispiel für eine unterschiedliche Reaktion dieser beiden mitochondrialen Indikatorsysteme gibt Abbildung 12.

Die Zugabe von AOA verursachte eine Reduktion der Pyridinnukleotide und eine starke Oxidation der Flavoproteide

(Abb. 13). Die Zugabe von Pyruvat hatte eine vorübergehende Oxidation der Pyridinnukleotide zur Folge, wogegen die Flavinfluoreszenz anfänglich unverändert blieb. Nach einer Latenzzeit kam es jedoch zu einer Reduktion beider Coenzyme. Die folgende Erklärung bietet sich an: durch Pyruvat wurde zunächst das cytoplasmatische NAD/NADH-System oxidiert - als Folge der Reaktion des Pyruvats mit der Laktat-Dehydrogenase; anschließend kam es zu einer zunehmenden Pyruvatoxidation durch die mitochondrielle Pyruvat-Dehydrogenase, wodurch sowohl die Flavinnukleotide als auch die Pyridinnukleotide reduziert wurden. Wenn AOA in Anwesenheit von Laktat zugegeben wurde, wurden beide Coenzyme, die sich nach der Laktatinfusion in einem hoch reduzierten Zustand befanden, oxidiert (Abb. 14). Offensichtlich wurde durch AOA das mitochondrielle NAD/NADH-System stärker oxidiert als das bereits reduzierte cytoplasmatische NAD/NADH-System weiter reduziert wurde.

Äthanolzugabe bewirkt eine rasche Reduktion der Pyridinnukleotide und der Flavoproteide, was durch Registrierung der Oberflächenfluoreszenz demonstriert werden kann [39, 55](Abb. 15). In Anwesenheit von AOA waren diese Redoxänderungen deutlich vermindert, die Änderungen in der Flavinfluoreszenz waren unter diesen Bedingungen fast vollständig aufgehoben (Abb. 15).

3.3. Auswirkungen von AOA auf den Äthanolabbau

Äthanol wird in der Leber zum größten Teil unter Mitwirkung der Alkohol- und Acetaldehyddehydrogenase zu Acetat oxidiert, zum kleineren Teil wird er peroxidatisch zu Acetaldehyd abgebaut.[56,57]. Das Endprodukt, Acetat, verläßt die Leber und wird in extrahepatischen Geweben (u.a. in der Niere [58]) metabolisiert. Nur ein kleiner Teil des gebildeten Acetats wird in Form von Acetyl-CoA in den

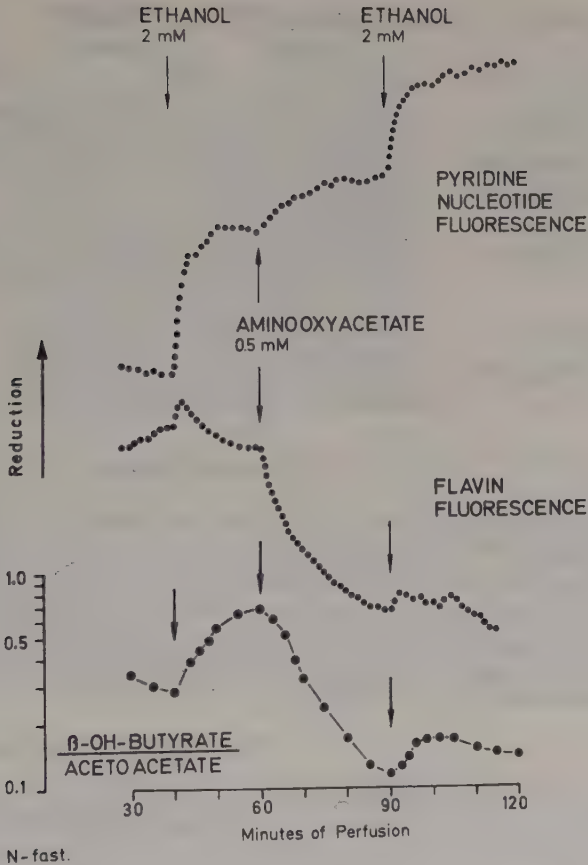


Abb. 12 Änderungen der Flavin- und Pyridinnukleotid-Fluoreszenz und der B/A-Quotienten
Die Leber einer Ratte im Hungerzustand wurde mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Änderungen in der Fluoreszenzintensität wurden mit Hilfe des Doppelstrahlfluorometers von der Oberfläche registriert (siehe Kap. 2.3.). Die obere Kurve stellt die Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide, die mittlere die der oxidierten Flavoproteide dar. Eine Aufwärtsbewegung bedeutet Reduktion beider Parameter. Zeitgleich aufgetragen sind die B/A-Quotienten im Perfusat. Die Zugabe von Äthanol und AOA ist durch Pfeile angedeutet.

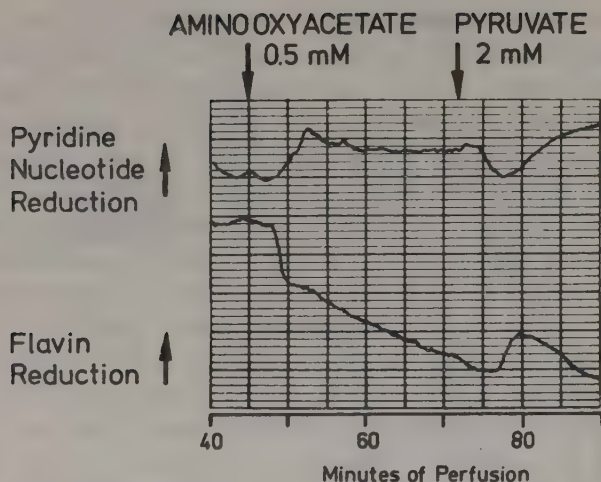


Abb. 13 Änderungen im Redoxzustand der Flavine und der Pyridinnukleotide nach Zugabe von AOA
Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Oberflächenfluoreszenz wurde wie in Abb. 12 gemessen. Ein vertikaler Rasterabstand entspricht einer Fluoreszenzänderung von 5% bei Pyridinnukleotiden und 2.5% bei Flavoproteiden. Die Zugabe von Pyruvat und AOA ist durch senkrechte Pfeile angezeigt.

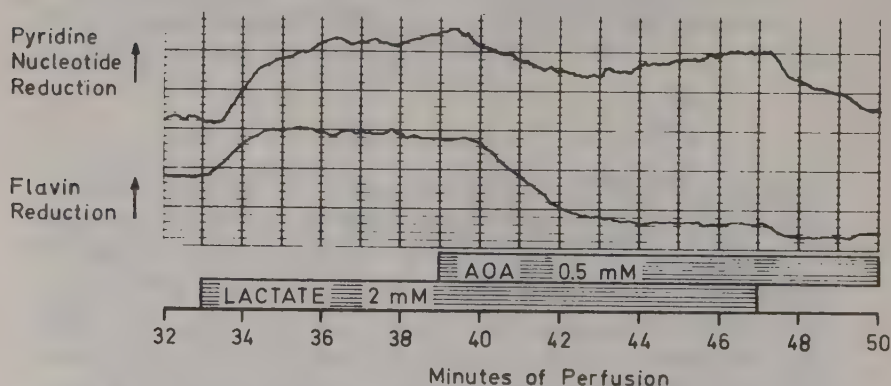


Abb. 14 Flavin- und Pyridinnukleotid-Fluoreszenzänder-

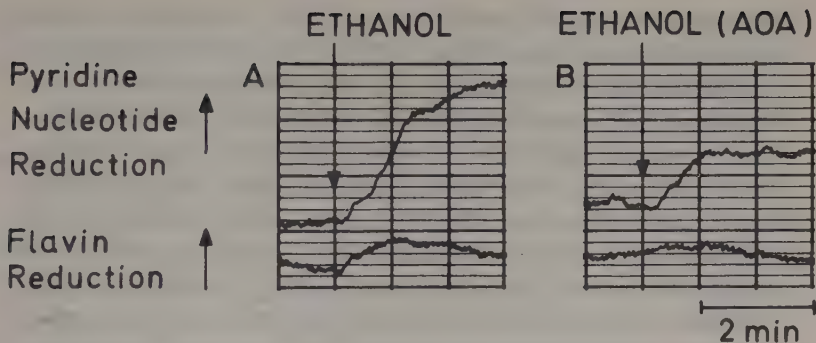


Abb. 15 Änderungen der Flavin- und Pyridinnukleotid-Fluoreszenz durch Äthanol in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von AOA

Die Leber einer Ratte im Hungerzustand (24 Std. Nahrungs-entzug) wurde mit rezirkulierendem Medium perfundiert. Die Oberflächenfluoreszenz wurde wie in Abb. 12 gemessen. Ein vertikaler Rasterabstand entspricht einer Fluoreszenzänderung von 5% bei Pyridinnukleotiden und 4% bei Flavoproteiden, verglichen mit den Änderungen nach 4 minütiger Anoxie. Ein horizontaler Rasterabstand entspricht dem Zeitraum von einer Minute. Zugaben: Äthanol (2 mM) nach 35 Minuten (links); AOA (0.5 mM) nach 80 Minuten (nicht abgebildet); Äthanol (2 mM) nach 95 Minuten Perfusionsdauer (rechts). Zum Zeitpunkt der AOA-Zugabe war das vorher applizierte Äthanol bereits vollständig metabolisiert.

Fortsetzung der Legende zu Abb. 14

ungen nach Zugabe von AOA in Anwesenheit von Laktat
Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit nicht rezirkulierendem Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Die Oberflächenfluoreszenz wurde wie in Abb. 12 gemessen. Ein vertikaler Rasterabstand entspricht einer Fluoreszenzänderung von 4% bei Pyridinnukleotiden und 3% bei Flavoproteiden, verglichen mit den Änderungen nach 4 minütiger Anoxie. Die Infusion von Laktat und AOA ist durch horizontale Balken angezeigt.

Leberstoffwechsel eingeschleust. Neben dem Acetat entsteht bei der Reaktion des Äthanol mit der Alkohol- und Acetaldehydehydrogenase eine Flut von reduzierenden Äquivalenten, die in der Atmungskette oxidiert werden müssen. Wegen der Lokalisation der Dehydrogenasen im cytoplasmatischen Raum ist ein Wasserstofftransport über die Mitochondrienmembran obligatorisch. Aus diesem Grund eignet sich der Äthanolabbau besonders als Indikator für den Wasserstofftransport. Darüberhinaus handelt es sich um einen Stoffwechselweg, der nicht, wie alle anderen, durch viele Nebenschlüsse mit dem restlichen Stoffwechsel verquickt ist.

3.3.1. Äthanolabbau in Anwesenheit von Aminooxyacetat und Inhibitoren der Atmungskette

Die perfundierte Leber gefütterter Tiere baut Äthanol mit konstanter Geschwindigkeit ab, bis die Alkoholkonzentration im Perfusat auf 2 mM abgefallen ist. Im Diagramm der Abbildung 16 sind insgesamt 24 Experimente zusammengefaßt (8 Experimente in jeder Gruppe). Es zeigt die Wirkungen von AOA und Inhibitoren der Atmungskette auf die Geschwindigkeit des Äthanolabbaus. In Abwesenheit der Hemmstoffe wurde ein durchschnittlicher Äthanolabbau von 68 $\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$ gemessen. Diese Geschwindigkeit verminderte sich nach Zugabe von AOA schnell auf 50% des Ausgangswertes. Die Hemmung ließ allerdings nach längerer Einwirkung des Inhibitors nach. Mit Inhibitoren der Atmungskette hingegen war die maximale Hemmung erst nach 30 Minuten erreicht. Sie betrug 81% für Antimycin A und 72% für Rotenon. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 16). Die Kinetiken der Hemmung des Äthanolabbaus korrelierten sehr gut mit denen des Sauerstoffverbrauches (Abb. 17).

Wenn die Oxidation von cytosolischen, reduzierenden Äquivalenten durch die mitochondrielle Atmungskette vermindert ist - entweder durch die Hemmung der Atmungskette oder durch eine Blockade des Wasserstofftransportes - werden vermehrt reduzierte Substrate, z.B. Laktat (Abb. 4, Tab. 2) an das Perfusat abgegeben. Ein weiteres Substrat dieser Art ist Glycerin. Bei Perfusion von Lebern gefütterter Ratten erschien normalerweise kein Glycerin im Perfusat. Auch die Zugabe von Äthanol, AOA oder Rotenon hatte keinen Einfluß auf die Glycerinproduktion. Nach Zugabe von Antimycin A kam es jedoch zu einer deutlichen Ausschüttung von Glycerin (Abb. 18). Dieser Befund ist ein Hinweis dafür, daß α -Glycerophosphat, das offensichtlich in Anwesenheit von Rotenon noch oxidiert werden konnte, nach Hemmung der Atmungskette im Bereich zwischen Cytochrom b und c_1 in der Zelle angehäuft und dephosphoryliert wurde.

3.3.2. Titration von Aminooxyacetat

Die AOA-Konzentration für halbmaximale Hemmung wurde bisher nur an isolierten Transaminasen bestimmt [22,23]. Sie wird mit Werten in der Größe zwischen 10^{-5} und 10^{-7} M angegeben, und ist damit etwa 100 mal geringer als die in den bisher beschriebenen Experimenten angewandten AOA-Konzentrationen. Diese Hemmstoffkonstanten können jedoch nicht ohne weiteres auf in vivo Verhältnisse übertragen werden. In einer Versuchsreihe mit perfundierten Lebern sollte deshalb die durch steigende AOA-Konzentrationen hervorgerufene Hemmung des Äthanolabbaus bestimmt werden.

Jeweils an einer Leber wurde die Hemmung von fünf verschiedenen AOA-Konzentrationen sowie von Antimycin A auf die Geschwindigkeit des Äthanolabbaus gemessen. Um die einzelnen Werte vergleichen zu können, war es notwendig, ident-

tische Ausgangsbedingungen zu schaffen. Aus diesem Grunde wurde das Perfusat, das mit Ausnahme der steigenden AOA-Mengen völlig identisch war, nach zeitgleichen Intervallen (12 min) ausgetauscht (Volumenbestimmung mit Tritium-Wasser), sodaß der Leber in jedem Intervall Perfusat gleicher Zusammensetzung angeboten wurde. Das Perfusat enthielt 10 mM Äthanol, 10 mM Glucose und 2 mM Laktat. Die beiden letzteren Substrate wurden lediglich hinzugegeben, um eine mögliche Beeinflussung des Äthanolabbaus durch die Bedingung einer stimulierten Glycogenolyse und Glycolyse zu vermeiden. Die Äthanolkonzentration wurde alle 30 Sekunden analysiert. Aus den einzelnen Meßwerten wurde eine Regressionsgerade berechnet, die als Grundlage für die Berechnung der Geschwindigkeit des Alkoholabbaus diente. Die Ergebnisse eines Titrationsexperimentes sind in Abbildung 19 zu finden. Die Konzentration für halbmaximale Hemmung lag im Bereich zwischen 0.1 und 0.3 μ M. Die maximale Hemmung betrug 45% des Äthanolabbaus in Abwesenheit von Inhibitoren. Unter Antimycin A war die Geschwindigkeit des Äthanolabbaus um 70% vermindert. Wenn man annimmt, daß die Antimycin A hemmbare Äthanoloxidation den gesamten Wasserstofftransport von reduzierenden Äquivalenten des Äthanols repräsentiert, dann kann man schließen, daß zwei Drittel des Wasserstofftransportes, der bei der Äthanoloxidation unter diesen Bedingungen erforderlich ist, durch den Transaminasen-Hemmstoff AOA blockiert werden können. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse von insgesamt sieben Titrationsexperimenten zusammengefaßt. Auch hier ist zu erkennen, daß die AOA-Konzentration für halbmaximale Hemmung kleiner als 1 μ M war; die maximale Hemmung war 50% des ungehemmten Äthanolabbaus, bzw. 68% des durch Antimycin A hemmbaren Äthanolabbaus.

INHIBITION OF ETHANOL CONSUMPTION IN PERFUSED LIVER

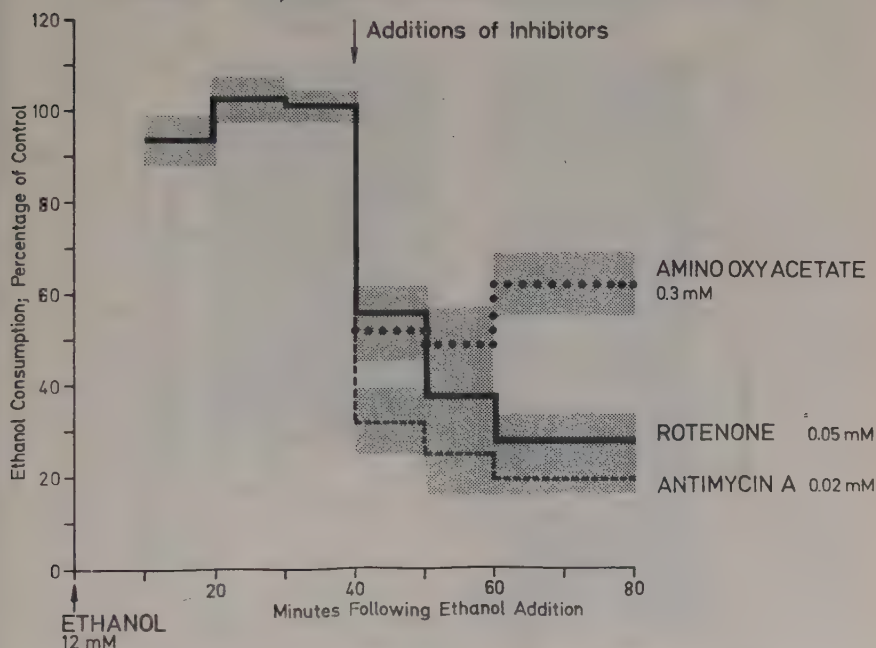


Abb. 16 Hemmung des Äthanolabbaus durch AOA, Rotenon und Antimycin A

Die Lebern von gefütterten Ratten wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Nach 30 minütiger Perfusionsdauer wurde Äthanol mit einer Anfangskonzentration von 12 mM zugegeben. Proben wurden alle 10 Minuten entnommen und die Äthanolkonzentration gemessen. 40 Minuten nach Zugabe von Äthanol wurden die verschiedenen Hemmstoffe zugegeben. Die Geschwindigkeit des Äthanolabbaus wurde aus den Konzentrationsdifferenzen in dem Bereich zwischen 12 und 6 mM berechnet und um den Wert korrigiert, der unter Stickstoff auf der Leberoberfläche und im Perfusionssystem verdampfte. Die Geschwindigkeiten sind als Prozente der Kontrollperiode ausgedrückt (d.i. der Mittelwert von drei zeitgleichen Intervallen unmittelbar vor Zugabe der Hemmstoffe); 100% = $68 \pm 5 \mu\text{Mol/g Leber (feucht)} \times \text{h}$ (Mittelwert + S.E.M.). Die Linien repräsentieren den Mittelwert von 7 Experimenten in jeder Gruppe, die schraffierten Felder bedeuten 2x Standardabweichung. Unter AOA waren noch $49 \pm 8\%$ des Äthanolabbaus, unter Rotenon noch $28 \pm 6\%$, und unter Antimycin A noch $19 \pm 4\%$ nachweisbar.

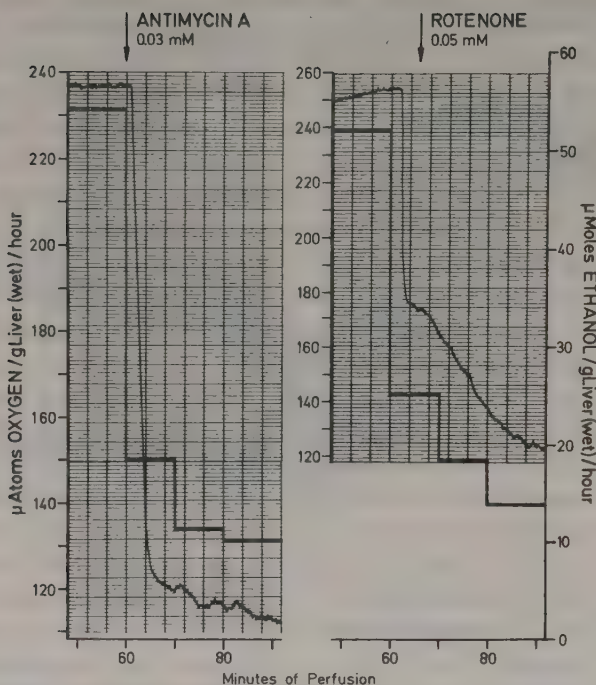


Abb. 17 Hemmung des Äthanolabbaus und der Sauerstoffaufnahme durch Antimycin A (links) und Rotenon (rechts). Die Lebern gefütterter Ratten wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Es sind zwei Einzelexperimente aus der Versuchsserie der Abb. 16 dargestellt (Versuchsbeschreibung siehe dort).

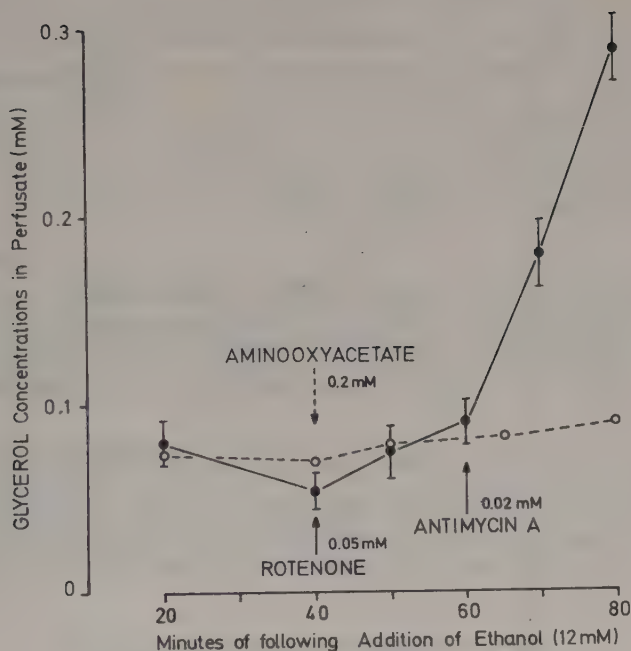


Abb. 18 Glycerinkonzentration im Perfusat in Ab- und Anwesenheit von AOA, Rotenon und Antimycin A
Die Lebern von gefütterten Tieren wurden mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer perfundiert. Äthanol wurde mit einer Anfangskonzentration von 12 mM zugegeben. 40 Minuten später wurde entweder AOA (0.2 mM, gestrichelte Linie, Mittelwerte von 2 Experimenten), oder Rotenon (0.05 mM) und 20 Minuten später Antimycin A (0.02 mM, ausgezogene Linie, Mittelwerte $\pm$ S.E.M., $n = 5$) zugegeben.

RATES OF ETHANOL UTILIZATION

Inhibition by Aminoxyacetate and Antimycin A

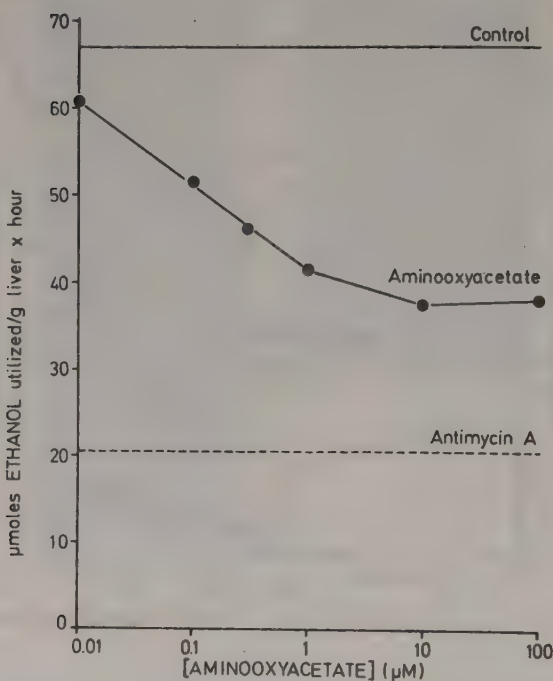


Abb. 19 Titration von Aminoxyacetat

Die Leber einer gefütterten Ratte wurde mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer, der zusätzlich 10 mM Äthanol, 10 mM Glucose und 2 mM Laktat enthielt, in Anwesenheit von verschiedenen AOA-Konzentrationen perfundiert. Das Perfusat wurde jeweils nach 12 minütiger Dauer abgeleitet und durch Medium gleicher Zusammensetzung, aber steigender Hemmstoffkonzentrationen, ersetzt. Die Äthanolkonzentrationen wurden in Perfusatsproben, die im Abstand von 30 Sekunden entnommen wurden, gemessen. Aus den Regressionsgeraden der abfallenden Äthanolkonzentrationen und den Perfusionsvolumina wurden die Geschwindigkeiten des Äthanolabbaus berechnet. Von diesen wurde der 'Stickstoffwert' (d.h. Verdampfen von Äthanol an der Leberoberfläche und im Perfusionsystem bei längerer Perfusion mit Stickstoff in der Gasphase) abgezogen. Die

Aminooxyacetat (μM)	0	1	10	100	100
Antimycin A (μM)	0	0	0	0	20
Äthanolabbau ($\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$)	71.0 +4.0	48.5 +7.0	37.7 +4.8	36.0 +4.1	19.4 +2.0
	100%	68%	53%	51%	27%

Tab. 3 Geschwindigkeit des Äthanolabbaus in Lebern gefütterter Ratten, perfundiert mit rezirkulierendem Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer, in Abwesenheit von Hemmstoffen und in Anwesenheit von AOA und Antimycin A. Mittelwerte von 7 Experimenten $\pm$ S.E.M.

Fortsetzung der Legende zu Abb. 19

durchgezogene Linie im Diagramm (oben) entspricht der Geschwindigkeit des Äthanolabbaus in Abwesenheit von Hemmstoffen, die gestrichelte Linie (unten) zeigt die Geschwindigkeit in Anwesenheit von 0.02 mM Antimycin A.

4. Diskussion

4.1. Aminooxyacetat, ein Hemmstoff von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen

Hydroxylamin und dessen acetyliertes Derivat, Aminooxyacetat, werden seit längerer Zeit als Hemmstoffe von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen benützt [22,24-27]. Experimente an isolierten Transaminasen, vor allem an der Glutamat-Pyruvat-Transaminase und der γ -Aminobutyrat- α -Ketoglutarat-Transaminase [21-23], zeigten eine kompetitive Hemmung für Aminosäuren und eine nicht-kompetitive Hemmung für α -Ketosäuren. Auch in komplexeren Systemen blieb die Zugabe von AOA nicht wirkungslos: In Experimenten an Hirnschnitten konnte die Bildung von γ -Aminobuttersäure unterdrückt werden [22,24]; in der vorliegenden Arbeit wird u.a. gezeigt, daß die Einschleusung von Alanin in den intermediären Stoffwechsel der perfundierten Rattenleber gehemmt ist (Gluconeogenese aus Alanin, Abb. 6). Bei diesen Prozessen, d.h. Synthese von γ -Aminobuttersäure oder Gluconeogenese und Harnstoffsynthese aus Aminosäuren, sind Reaktionen, die von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen katalysiert werden, erforderlich. Andererseits wurden Stoffwechselwege, die ohne offensichtliche Beteiligung von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen auskommen, wie z.B. Gluconeogenese aus Dihydroxyaceton (Abb. 7) oder Pyruvat (Abb. 5)[26] oder Ketogenese aus exogenen Fettsäuren (Abb. 8), durch AOA nicht beeinflußt. Es ist deshalb möglich, AOA nicht nur in Experimenten mit isolierten Enzymen, sondern auch in Experimenten mit mehr komplexen metabolischen Systemen (z.B. isolierte Zellen, Gewebsschnitte, perfundierte Organe, etc.) als spezifischen Hemmstoff einzusetzen.

4.2. Unspezifische Bindung von Carbonyl-Gruppen durch AOA

Langshaw und Mitarbeiter wiesen darauf hin [27], daß Aminooxyacetat nicht nur spezifisch das Pyridoxalphosphat - die prosthetische Gruppe der Transaminasen, - sondern auch unspezifisch α -Ketosäuren unter Bildung von Oximen binden könnte. Dies würde gänzlich neue Interpretationen der verschiedenen AOA-Effekte notwendig machen. Kleine Mengen von AOA könnten durch einen Überschuß an α -Ketosäuren gebunden werden, oder umgekehrt, große Mengen an AOA könnten die nur in geringen Mengen vorhandenen intermediären Keto-säuren aus dem Gleichgewicht entfernen. Die Hemmung der Gluconeogenese aus Laktat durch AOA, bzw. das Unterbleiben einer Hemmwirkung bei Pyruvat als glucoplastische Substanz, könnte dann folgendermaßen erklärt werden: Im Fall der Gluconeogenese aus Laktat könnten die in geringen Konzentrationen vorliegenden Zwischenprodukte Pyruvat und Oxaloacetat durch AOA abgefangen und dadurch der Syntheseweg unterbrochen werden. Andererseits könnte im Überschuß zugefügtes Pyruvat diesen 'Block' durch Bindung des freien AOA überwinden.

Gegen diese Interpretationsmöglichkeit lassen sich die folgenden Befunde und Überlegungen anführen: (1) Bei Versuchen mit Glutamat als glucoplastisches Substrat wurde keine Hemmung der Gluconeogenese durch AOA beobachtet [27]. Diese Experimente zeigten zweierlei: erstens wurde Glutamat über die oxydative Desaminierung und nicht über eine Transaminierung in den Stoffwechsel eingeschleust, und zweitens wurden die α -Ketosäuren, die als Zwischenprodukte auftreten (z.B. α -Ketoglutarat und Oxaloacetat) durch AOA offensichtlich nicht in großen Mengen gebunden. (2) Eigene Experimente haben gezeigt, daß die Bindung von Keto-säuren durch Aminooxyacetat stark pH-abhängig ist. Wenn Ketosäuren (Pyruvat, α -Ketoglutarat, Oxaloacetat und Acetoacetat) in verschiedenen Konzentrationen mit verschie-

denen AOA-Mengen inkubiert wurden, dann verschwanden bei pH 7.4 maximal 15% des Pyruvat und 8% des α -Ketoglutarat (Tab. 4, 1 mM AOA). Inkubation bei pH 6.8 brachte deutlich größere Verluste (Abb. 20). Andererseits waren mit 0.1 mM AOA kaum Verluste nachweisbar. Erhebliche Substratverluste wurden jedoch beobachtet, wenn das übliche Extraktionsverfahren von Perfusat- und Gewebeproben (Extraktion mit 2 M HClO_4 und Neutralisation mit 1.65 M K_2CO_3) simuliert wurde (Tab. 4 und Abb. 20). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß eine unspezifische Bindung von Ketosäuren durch AOA unter den Bedingungen des zellulären Milieus sehr gering ist und wahrscheinlich die Stoffwechselkoordinationen nicht beeinflußt. Dagegen sind die Gewebsgehalte an α -Ketosäuren, die in säurelöslichen Gewebsextrakten gemessen wurden [26], mit Sicherheit zu niedrig, wenn AOA anwesend war (nur 20% bei Pyruvat mit 1 mM AOA). Aus diesem Grunde wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit auf Säureextraktion des Perfusats und hohe AOA-Konzentrationen verzichtet. (3) Halbmaximale Hemmung des Äthanolabbaus wurde bei AOA-Konzentrationen um 1 μM gefunden. Bei einem Perfusionsvolumen von 100 ml entspricht dies einer Menge von etwa 0.012 μMol AOA/g Leber. Der Gehalt der Leber an Pyridoxal wird mit 0.01 - 0.03 $\mu\text{Mol/g}$ Leber angegeben [59,60]. Für halbmaximale Hemmung ist also kein Überschuß an AOA erforderlich. Der Gewebsgehalt an α -Ketosäuren ist jedoch um 2 - 3 Größenordnungen höher. Aus diesen quantitativen Beziehungen kann geschlossen werden, daß eine unspezifische Reaktion von Ketosäuren und AOA, die sich entweder in einer Störung der Stoffwechselkoordination (d.h. durch Bindung intermediärer Metabolite), oder in einer Aufhebung der Transaminasen-Hemmung (d.h. durch Wegfangen von AOA durch hohe Konzentrationen an α -Ketosäuren) bemerkbar machen würde, unwahrscheinlich ist.

Aminooxyacetat	0.1 mM		0.5 mM		1.0 mM	
	HClO_4 K_2CO_3	pH 7.4	HClO_4 K_2CO_3	pH 7.4	HClO_4 K_2CO_3	pH 7.4
Substrat (mM)						
Pyruvat						
0.05	84	96	39	89	22	85
0.2	87	96	38	90	15	83
1.0	91	100	55	94	23	86
α -Ketoglutarat						
0.05	92	100	79	99	62	96
0.2	96	99	79	96	58	92
1.0	96	98	74	96	45	94
Oxaloacetat						
0.01	100	--	100	--	100	--
0.07	100	--	80	--	63	--
0.37	100	--	87	--	65	--
Acetoacetat						
0.2	95	96	83	94	72	96
0.49	100	100	80	100	69	100
0.96	99	100	85	100	67	100
1.7	100	100	96	100	83	100

Tab. 4 "Recovery" von Ketosäuren nach Inkubation mit AOA. Pyruvat, α -Ketoglutarat, Oxaloacetat und Acetoacetat wurden mit AOA bei 37°C 10 Minuten inkubiert. Die Inkubationslösung war Albumin-Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer, pH 7.4. Ein Teil der Inkubationsansätze wurde mit 2 M HClO_4 extrahiert und anschließend mit K_2CO_3 auf pH 7.4 neutralisiert, bevor die Ketosäuren enzymatisch bestimmt wurden. Die wiedergefundenen Konzentrationen wurden als Prozent der Anfangskonzentration, d.i. die Konzentration in Abwesenheit von AOA, angegeben. Mittelwerte von jeweils 5 Bestimmungen.

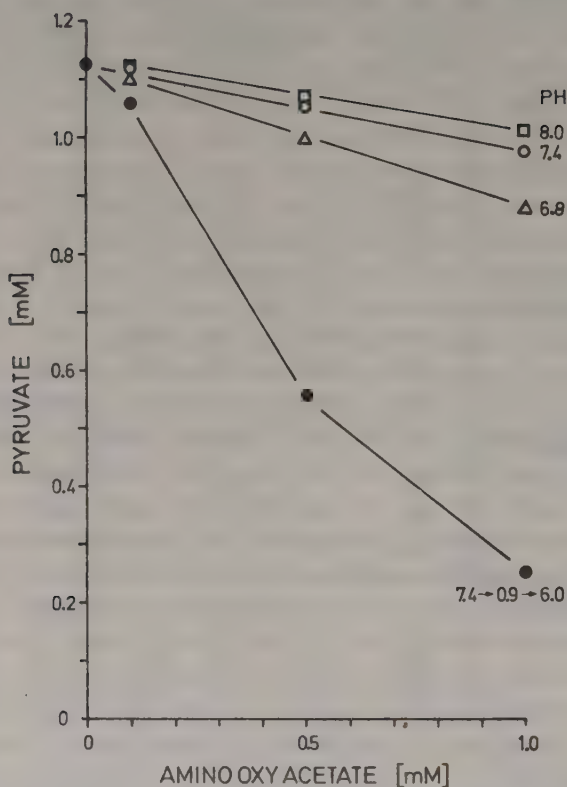


Abb. 20 "Recovery" von Pyruvat nach Inkubation mit verschiedenen AOA-Konzentrationen bei unterschiedlichem pH. Die Experimente wurden durchgeführt, wie es in der Legende zu Tabelle 4 beschrieben ist. Inkubation bei pH 8.0 ($\square$), pH 7.4 ($\circ$) und pH 6.8 (Δ). ($\bullet$): Inkubation bei pH 7.4, anschließend Extraktion mit HClO_4 ($\rightarrow$ pH 0.9) und Neutralisation mit K_2CO_3 ($\rightarrow$ pH 6.0). Mittelwerte von jeweils 5 Bestimmungen.

4.3. Hemmung des intrazellulären Wasserstofftransportes durch Aminooxyacetat

Die vorliegende Arbeit beschreibt verschiedene Stoffwechselwirkungen des Transaminasenhemmstoffes AOA. Es muß gefragt werden, ob diese verschiedenen Effekte durch einen gemeinsamen Mechanismus erklärt werden können. Hinsichtlich der verminderten Produktion von Glucose und Harnstoff aus endogenen und exogenen Aminosäuren liegt die Erklärung auf der Hand: AOA hemmt die Pyridoxalphosphat-abhängigen Transaminasen, die die Einschleusung der Aminosäuren in den intermediären Stoffwechsel katalysieren. Dagegen sind andere Effekte, z.B. der verminderte Abbau von Äthanol oder Glycerin oder Änderungen der Redoxquotienten, nicht notwendigerweise durch eine Hemmung Pyridoxalphosphat-abhängiger Enzyme zu erklären. Es fällt jedoch auf, daß bei den Stoffwechselwegen oder Parametern, die durch AOA beeinflußt werden, ein Transport reduzierender Äquivalente aus dem Cytosol in die Mitochondrien beteiligt ist. Die NAD-abhängige Oxidation von Äthanol, die Gluconeogenese aus Glycerin oder der Abbau von Glucose zu Pyruvat sind solche Prozesse, die im Cytosol ablaufen und bei denen ein Überschuß an reduzierenden Äquivalenten entsteht, der nur durch Oxidation in der mitochondriellen Atmungskette beseitigt werden kann. Andererseits wird der Stoffwechsel von Substraten, die im mitochondriellen Raum oxidiert werden (z.B. Fettsäuren und Pyruvat) nicht durch AOA beeinträchtigt. Es kann daher angenommen werden, daß ein gemeinsamer Mechanismus für die verschiedenen AOA-Effekte die Hemmung des intrazellulären Wasserstofftransportes ist.

Auf der Grundlage des von Bücher entwickelten Konzeptes des Wasserstofftransportes mit Hilfe von Substratpaaren, [3], für die auf beiden Seiten der Mitochondrienmembran Dehydrogenasen zur Verfügung stehen (z.B. α -Glycerophos-

phat-Zyklus, Malat-Zyklus), postulierte 1961 Borst den sog. Malat-Aspartat-Zyklus [5]. Seine Hypothese beruhte auf der bekannten Tatsache, daß sowohl im Cytosol als auch innerhalb der Mitochondrien Malat-Dehydrogenasen und Glutamat-Oxaloacetat-Transaminasen von hoher Aktivität vorhanden sind [61,62]. Es wird gefordert, daß im Cytosol Oxaloacetat der Akzeptor für reduzierende Äquivalente ist, die dann als Malat durch die Mitochondrienmembran transportiert werden. Malat reduziert mitochondrielles NAD. Um in der Bilanz einen ausschließlichen Wasserstofftransport zu bekommen, muß Oxaloacetat, das bei der mitochondriellen Oxidation des Malat entstanden ist, wieder in das Cytosol zurückgelangen. Die Impermeabilität der Mitochondrienmembran [11] wird durch Transaminierung zu Aspartat umgangen. Aspartat passiert die Mitochondrienmembran und wird im

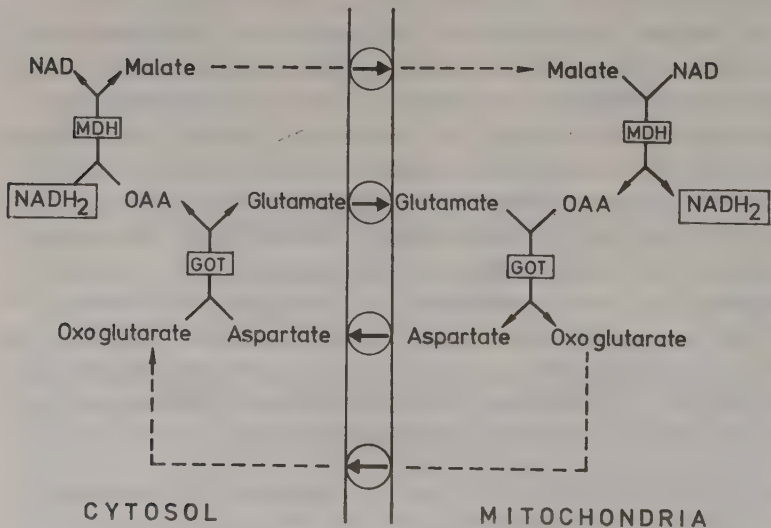


Abb. 21 Schema des Malat-Aspartat-Zyklus

Cytosol durch erneute Transaminierung zu Oxaloacetat umgewandelt, das als Wasserstoffakzeptor erneut zur Verfügung steht (Abb. 21). Um 1 Mol Wasserstoff in die Mitochondrien zu transportieren, muß demnach je ein Mol Malat und Glutamat aus dem Cytosol in den mitochondriellen Raum geschafft werden, während je ein Mol Aspartat und α -Ketoglutarat in umgekehrter Richtung fließen. Als Borst diesen Zyklus vor 12 Jahren postulierte, bestand die allgemeine Vorstellung, daß diese Metabolite in Richtung eines Konzentrationsgradienten durch die Mitochondrienmembran diffundieren. Inzwischen ist aber bekannt, daß für den Transport dieser Metabolite in der Mitochondrienmembran spezifische "Carrier" oder Translokasen existieren. Chappell et al. beschrieben Carrier, die Malat im Austausch gegen α -Ketoglutarat und Aspartat im Austausch gegen Glutamat transportieren [63].

Die Aktivitäten sowohl der Malat-Dehydrogenasen und Glutamat-Oxaloacetat-Transaminasen als auch der Malat/ α -Ketoglutarat und Aspartat/Glutamat-Carrier, die in Leberhomogenaten bzw. an isolierten Lebermitochondrien gemessen wurden [61-64], sind um 2 - 3 Größenordnungen höher als der Wasserstofffluß, den man z.B. beim Äthanolabbau maximal zu erwarten hat (d.i. ca. 140 $\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$ bei einem Äthanolabbau von 70 $\mu\text{Mol/g} \times \text{h}$, Abb. 16). Die Enzymausstattung der Leber bietet also die Voraussetzung für ein Funktionieren des Malat-Aspartat-Zyklus. Die Hemmung von Stoffwechselwegen, die mit einem Wasserstofftransport verknüpft sind, durch den Transaminaseninhibitor AOA liefert den Beweis für die Existenz dieses Zyklus in der Leberzelle.

4.4. Hemmung des Äthanolabbaus

Die NAD-abhängige Äthanoloxidation ist an die Endoxidation von reduzierenden Äquivalenten in der mitochondriellen Atmungskette gebunden. Da die beteiligten Dehydrogenasen

(Alkohol- und Azetaldehyddehydrogenase) ausschließlich, bzw. vorwiegend, im Cytosol lokalisiert sind [65], ist ein Wasserstofftransport durch die Mitochondrienmembran erforderlich. Der Abbau des Äthanol kann aus diesem Grunde als Indikator für den Wasserstofffluß vom Cytosol in die Mitochondrien benutzt werden. Mit Hemmstoffen der Atmungskette, Antimycin A und Rotenon, sowie mit AOA kann differenziert werden, über welche Wege der Wasserstoff in die Atmungskette fließt. Der Teil des Wasserstoffflusses, der zum Eintritt in den mitochondriellen Raum den Malat-Aspartat-Zyklus benützt, sollte durch AOA hemmbar sein. Rotenon sollte dagegen alle Anteile des Wasserstoffflusses erfassen, die über die mitochondrielle NADH-Oxidase die Atmungskette erreichen. Dagegen sollte Rotenon keinen Einfluß auf den Teil des Wasserstoffflusses haben, der via α -Glycerophosphat-Zyklus die Atmungskette erreicht. Antimycin A schließlich, dessen Wirkort näher an der Sauerstoffseite der Atmungskette liegt, sollte den Gesamtfluß des Äthanolwasserstoffes anzeigen.

In Anwesenheit von AOA war die Geschwindigkeit des Äthanolabbaus um 50% vermindert. Bei totalem Block der Atmungskette mit Antimycin A waren noch 20% der anfänglichen Abbaugeschwindigkeit nachweisbar (Abb. 16). Dieser Rest kann Ausdruck einer inkompletten Hemmung oder aber die Folge einer NADH-Oxidation im Cytosol sein, wobei die reduzierenden Äquivalente die Zelle in Form von reduzierten Substraten, z.B. Glycerin, verlassen. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber um einen NAD-unabhängigen, peroxidatischen Alkoholabbau durch Katalase in Anwesenheit von H_2O_2 bildenden Reaktionen [57]. Unter der Voraussetzung, daß Antimycin A den gesamten Wasserstofffluß der NAD-abhängigen Äthanoloxidation erfaßt, kann man abschätzen, daß zumindest zwei Drittel des Wasserstoffes über den Malat-Aspartat-Zyklus zur Atmungskette gelangen. Unklar ist aller-

dings, ob das restliche Drittel über denselben Zyklus transportiert wird (dies würde nur zutreffen, wenn man eine inkomplette Hemmung postuliert, was nach den Titrationsexperimenten unwahrscheinlich ist), oder ob es durch Diffusion von Oxaloacetat oder über einen anderen Zyklus, wie den Fettsäureverlängerungszyklus [7,8], den Malat-Citrat-Zyklus [63] oder den α -Glycerophosphat-Zyklus [3], die Permeabilitätsschranke passiert. Der α -Glycerophosphat-Zyklus ist mit großer Wahrscheinlichkeit beteiligt, denn Glycerin wurde erst in Anwesenheit von Antimycin A, nicht aber in Anwesenheit von Rotenon ins Perfusat abgegeben (Abb. 18). Die Beteiligung des α -Glycerophosphat-Zyklus am gesamten Wasserstofffluß beträgt jedoch nur maximal 10% (Unterschied zwischen Rotenon- und Antimycin A-Hemmung). Dieser Unterschied zwischen dem Rotenon- und Antimycin A-hemmbareren Anteil des Äthanolabbaus ließ sich nicht durch Zugabe von Glycerin oder durch Thyroxin-Vorbehandlung der Tiere steigern. Unter beiden Bedingungen sollten besonders günstige Voraussetzungen für das Funktionieren des α -Glycerophosphat-Zyklus gegeben sein.

4.5. Der Kohlenhydrat-Metabolismus in Anwesenheit von Aminoxyacetat

Beim glycolytischen Abbau der Glucose zu Pyruvat entstehen reduzierende Äquivalente (Glyceraldehyddehydrogenase-Reaktion), deren Oxidation in der mitochondriellen Atmungskette die Voraussetzung für den weitergehenden Abbau des Pyruvats (z.B. oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA) ist. Unter hypoxischen Bedingungen und in Situationen, in denen die Atmungskette blockiert oder der Wasserstofftransport gehemmt ist, dient Pyruvat als extramitochondrieller Akzeptor dieser reduzierenden Äquivalente. In Anwesenheit von AOA wurde vermehrt Laktat von der perfundierten Leber gefüttert-

ter Tiere abgegeben (Tab. 2, Abb. 4). Glucose wurde dagegen nicht vermehrt ausgeschieden, was bei einer gesteigerten Glycogenolyse in Verbindung mit einer beschleunigten Glycolyse zu erwarten wäre. Die Ursache für die erhöhte Laktatproduktion liegt deshalb wahrscheinlich in einer Hemmung des Wasserstofftransportes in die Mitochondrien. Aus der Mehrproduktion von 20 μMol Laktat/g x h kann außerdem geschlossen werden, daß vor Zugabe von AOA eine entsprechende Menge an Pyruvat bei Reaktionen im mitochondriellen Raum metabolisiert wurde. In Anwesenheit von AOA scheint demnach Pyruvat als Substrat für mitochondrielle Oxidationen nicht mehr zur Verfügung zu stehen. Die Abnahme der B/A-Quotienten, die einen mehr oxidierten Status mitochondrieller Redoxsysteme andeuten, kann ein Zeichen für einen Substratmangel sein. Außerdem ist zu erwarten, daß Acetyl-CoA aus der β -Oxidation der Fettsäuren in vermehrtem Maße in den Zitratzyklus eingeschleust wird, und folglich nicht mehr für die Ketogenese zur Verfügung steht. Die Beobachtung, daß sowohl die Abnahme der B/A-Quotienten als auch die verminderte Ketogenese nach AOA nach Zugabe von Pyruvat rückgängig gemacht werden können, steht in Einklang zu dieser Überlegung (Abb. 5).

Am Beginn des Laktat-Metabolismus steht die Oxidation zu Pyruvat. Die entstehenden reduzierenden Äquivalente müssen anschließend in die Mitochondrien transportiert und dort oxidiert werden, um den Prozeß in Gang zu halten. Der Laktat-Metabolismus, sei es die Umwandlung zu Glucose im gehungerten oder die Umwandlung über Acetyl-CoA zu Lipiden im gefütterten Zustand, ist deshalb von einem funktionierenden Wasserstofftransport abhängig. Unter beiden Stoffwechselbedingungen wurde in Anwesenheit von AOA exogenes Laktat nicht metabolisiert [66] (Abb. 5 und 10). Die Hemmung der Gluconeogenese aus Laktat durch AOA wurde kürzlich als ein Beweis herangezogen, daß das Kohlenstoffge-

rüst des Oxaloacetats in Form von Aspartat und nicht in Form von Malat die Mitochondrienmembran passiert [25,66]. Diese Experimente erlauben u.E. keinen Schluß auf den Weg des Kohlenstoffes; sie zeigen nur, daß Transaminasen bei der Gluconeogenese aus Laktat beteiligt sind. Transaminasen können deshalb sowohl beim Wasserstofftransport in die Mitochondrien hinein, als auch beim Kohlenstofftransport aus den Mitochondrien heraus beteiligt sein. Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß bei der Gluconeogenese aus C^{14} markiertem Laktat gleich große spezifische Aktivitäten im Malat und in der Glucose gefunden wurden, während Aspartat nur eine geringe Aktivität hatte [67]. Dies ist ein Hinweis dafür, daß der Kohlenstofffluß vom mitochondriellen in den cytoplasmatischen Raum über Malat und nicht über Aspartat läuft. Folglich ist nicht der Kohlenstofftransport durch AOA gehemmt, sondern die verminderte Bereitstellung von Pyruvat für die mitochondrielle Pyruvatcarboxylierung ist wahrscheinlich die Ursache für die Gluconeogenese-Hemmung durch AOA.

In ähnlicher Weise ist die Gluconeogenese aus Glycerin auf den Wasserstofftransport angewiesen. Ohne der Beseitigung der reduzierenden Äquivalente, die bei der Oxidation von α -Glycerophosphat zu Dihydroxyacetonphosphat frei werden, kann das Kohlenstoffgerüst des Glycerins nicht metabolisiert werden. Auch hier passen die experimentellen Daten gut zur theoretischen Überlegung: Die Gluconeogenese aus Glycerin, jedoch nicht diejenige aus Dihydroxyaceton war durch AOA beeinträchtigt (Abb. 7). Allerdings war die Hemmung geringer als diejenige, die man bei Laktat als gluconeogenetischen Precursor beobachtete. Unter diesen Bedingungen könnte jedoch der Wasserstofftransport über den α -Glycerophosphat-Zyklus erleichtert sein, sodaß ein Teil des Wasserstoffes auf diesem Wege die Mitochondrien erreicht. In Abwesenheit von exogenem Glycerin ist der α -Glycerophos-

phatgehalt des Lebergewebes $0.2 \mu\text{Mol/g}$ [68], und ist damit fast um eine Größenordnung niedriger als der K_m der mitochondrialen α -Glycerophosphat-Dehydrogenase [10]. Im Fall der Glycerininfusion fanden sich jedoch Konzentrationen um $7 \mu\text{Mol/g}$ Leber (eigene Messungen: $[\alpha\text{GP}]$ nach Infusion von 4 mM Glycerin = $6.4 \mu\text{Mol/g}$ Feuchtgewicht; $[\alpha\text{GP}]$ nach Infusion von 4 mM Glycerin in Anwesenheit von 0.5 mM AOA = $7.3 \mu\text{Mol/g}$ Feuchtgewicht), sodaß man annehmen kann, daß unter diesen Bedingungen der α -Glycerophosphat-Zyklus begünstigt ist.

4.6. Der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von Aminoxyacetat

Zugabe von AOA bewirkte unter allen Stoffwechselsituationen, denen die Leber unterworfen war, eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches (im Durchschnitt $30 \mu\text{gAtome/g} \times \text{h}$, d.i. etwa 10 - 15% des Gesamtsauerstoffverbrauches). Die Abnahme des Sauerstoffverbrauches kann folgende Ursachen haben: (a) direkte Hemmung der Atmungskette, (b) Mangel an Brennstoff für mitochondriale Oxidationen und (c) eingeschränkter Energieverbrauch durch verminderte biosynthetische Aktivität mit daraus resultierender Abnahme der Flußgeschwindigkeit durch die Atmungskette. Da energieverbrauchende Prozesse, wie Gluconeogenese aus Pyruvat und Dihydroxyaceton, durch AOA nicht beeinträchtigt waren, kann eine verminderte Bereitstellung von energiereichem Phosphat, wie es bei einem partiellen Block der Atmungskette zu erwarten wäre, ausgeschlossen werden. Auch ein möglicher Mangel an Substrat für mitochondriale Oxidationen (z.B. Pyruvat) scheint keine Ursache für den verminderten Sauerstoffverbrauch zu sein; denn dieser AOA-Effekt wurde auch in Situationen mit gesteigerter Fettsäureoxidation beobachtet, z.B. bei Lebern von gehungerten Ratten (Abb. 5) und nach Zugabe von Octanoat (Abb. 8). In Frage kommt des-

halb ein verminderter Sauerstoffverbrauch als Folge des eingeschränkten Energiebedarfs für anabole Prozesse, die durch AOA gehemmt wurden (z.B. Gluconeogenese und Harnstoffsynthese aus endogenen Aminosäuren [Tab. 2, Abb. 5]).

4.7. Redoxänderungen nach Zugabe von Aminoxyacetat

Sämtliche Redoxänderungen, die unter Einwirkung von AOA beobachtet wurden, lassen sich mit der Hypothese eines blockierten Wasserstofftransportes vom Cytosol in die Mitochondrien erklären. Verantwortlich für den verminderten Transport reduzierender Äquivalente ist, wie wir gesehen haben, die Blockierung des Malat-Aspartat-Zyklus. Wenn man sich den Malat-Aspartat-Zyklus als Schleusensystem vorstellt, das der Wasserstofffluß auf seinem Weg in die Mitochondrien passieren muß, kann man sich die Konsequenzen eines teilweisen Verschlusses bildhaft vor Augen führen. Ein teilweiser Verschuß einer Schleuse bedeutet einen erhöhten Wasserstand vor und Niedrigwasser hinter der Schleuse, bzw. - auf unser Zellsystem angewandt - einen Anstau reduzierender Äquivalente im Cytosol (d.i. Negativierung des NAD-NADH-Redoxpotentials, abzulesen an einem Anstieg der L/P-Quotienten) und Absinken des Wasserstoffdruckes im mitochondrialen Raum (d.i. Positivierung des NAD-NADH-Redoxpotentials, abzulesen an einem Absinken der B/A-Quotienten und an einer Oxidation mitochondrialer Flavinkomponenten). Diese Situation ist jedoch nur gegeben, wenn der Ort der initialen Substratoxidation im Oberlauf des Flusses, d.h. im Cytosol, liegt. Das ist der Fall beim glycolytischen Abbau von Glucose zu Pyruvat, bei der Äthanoloxidation oder bei der Metabolisierung von Laktat oder Glycerin (Abb. 11a und b). Bei der aeroben Glycolyse und der Laktatoxidation ist ein verminderter Wasserstofftransport zwangsläufig auch mit einer verminderten Bereitstellung von Pyruvat für mitochondriale Oxidationen ge-

koppelt, sodaß für das Absinken des mitochondrialen Wasserstoffdruckes auch die verminderte Pyruvatoxidation in Frage kommt. Unter besonderen Stoffwechselbedingungen, in denen der Ort der initialen Substratoxidation in den Mitochondrien liegt, d.h. im Unterlauf des Flusses, sollte das Schließen der Schleusentore keine Konsequenzen für den Wasserstand vor, wohl aber hinter der Schleuse nach sich ziehen. Das ist in der Tat der Fall: In Anwesenheit von exogenem Pyruvat oder Octanoat bewirkt AOA keine Oxidation der mitochondrialen Redoxpartner, jedoch eine Reduktion im Cytosol (Abb. 11c und d).

In diese Modellvorstellung paßt allerdings nicht die Oxidation mitochondrialer Redoxpartner, wenn Lebern gehungerter Tiere in Abwesenheit von exogenem Substrat perfundiert werden. Die metabolische Situation ist gekennzeichnet durch eine beschleunigte β -Oxidation der Fettsäuren mit Produktion von Ketonkörpern. Der Ort der initialen Substratoxidation ist also hier vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert. Möglicherweise besteht unter diesen Bedingungen auch eine gesteigerte Metabolisierung von endogenen Aminosäuren, deren Kohlenstoffskelett in den Zitratzyklus einmündet. Die verminderte Verstoffwechslung der Aminosäuren in Anwesenheit von AOA wäre dann eine Erklärung für den Abfall der mitochondrialen Redoxindikatoren.

Auf Grund von Messungen von Substratpaaren, die als Indikatoren für cytosolische (Laktat-Pyruvat, Mittelpotential = -215 mV [53]) bzw. das mitochondriale Redoxsystem (β -Hydroxybutyrat-Acetoacetat, Mittelpotential = -290 mV) dienen, wurde geschlossen, daß das Ist-Potential des mitochondrialen NAD-NADH-Systems um $40 - 60$ mV negativer als das cytosolische ist. Ein Wasserstofftransport vom Cytosol in die Mitochondrien müßte diese Potentialdifferenz überwinden, sodaß eine energieverbrauchende Reaktion einge-

schaltet werden müßte. Überlegungen dieser Art führten frühzeitig dazu, ein Transportsystem zu suchen, das Wasserstoff in Richtung des Potentialgefälles transportiert. Dies ist beim α -Glycerophosphat-Zyklus der Fall, bei dem das Potential der reduzierenden Äquivalente von -240 mV (cytosolisches NAD-NADH-System) auf etwa 0 mV (Flavin-Ubichinon-Cytochrom b Region der Atmungskette) fällt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, daß ein Transport vom cytosolischen zum mitochondrialen NAD-NADH-System, d.h. gegen das angenommene Potentialgefälle, erfolgt. Wie diese Potentialdifferenz überwunden wird, ist eine offene Frage.

Dazu sollen drei Möglichkeiten diskutiert werden:

1. Konzentrationsunterschiede von Metaboliten des Malat-Aspartat-Zyklus auf beiden Seiten der Mitochondrienmembran können eine treibende Kraft für den Wasserstofftransport gegen ein Potentialgefälle sein. Überlegungen dieser Art wurden von Williamson [69] angestellt. Die wahren Metabolitkonzentrationen in den verschiedenen zellulären Kompartimenten sind bisher jedoch unbekannt.
2. Die Potentialdifferenz beruht auf der Annahme, daß das Substratpaar der Ketonkörper im Gleichgewicht mit dem mitochondrialen NAD-NADH-System steht und daß dieses Redoxsystem identisch ist mit dem, das sowohl mit Malat-Oxalacetat als auch mit der NADH-Oxydase der Atmungskette reagiert. Diese Annahme ist u.W. bislang nicht endgültig bewiesen. Falls in der Tat verschiedene NAD-NADH-Systeme im Crista-Raum (β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase) und im Matrix-Raum (Malat-Dehydrogenase) existieren sollten, so könnte das β -Hydroxybutyrat-Acetoacetat-System nicht als der entscheidende mitochondriale Redoxindikator herangezogen werden. Veränderungen der B/A-Quotienten würden in diesem Falle zwar die Richtung der mitochondrialen Potentialänderungen, nicht jedoch den absoluten Potentialwert anzeigen. Auf Grund dieser Überlegungen erscheint es als möglich, - wenn auch als wenig

wahrscheinlich - daß eine Potentialdifferenz zwischen cytosolischem und mitochondrialem NAD-NADH-System nicht existiert und der Wasserstofftransport auf Grund von Gleichgewichtseinstellungen der am Malat-Aspartat-Zyklus beteiligten Reaktionen erfolgt.

3. Die Tatsache jedoch, daß Wasserstoff von Laktat oder Äthanol (Mittelpotential ca. -215 mV) innerhalb der Leberzelle mit Hilfe eines mitochondrialen Enzyms auf Acetoacetat übertragen und als β -Hydroxybutyrat (Mittelpotential -290 mV) wieder im Perfusat erscheint, spricht für das Vorhandensein einer Energie-abhängigen Reaktion bei der Wasserstoffübertragung zwischen Cytosol und Mitochondrien. Auch die Beobachtung, daß eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung mit geringen Konzentrationen von Dinitrophenol (50 μ M) den Äthanolabbau stimuliert, daß dagegen höhere Konzentrationen (200 μ M) den Äthanolabbau hemmen [70], ist in diesem Sinne zu deuten. Als die Reaktion, bei der im Malat-Aspartat-Zyklus ein Energieverbrauch - sei es in Form von ATP oder in Form von energiereichen Zwischenprodukten der oxydativen Phosphorylierung - möglich ist, kommt in Frage der durch Carrier vermittelte Transport von Aspartat durch die Mitochondrienmembran. Bereits 1962 zeigte Klingenberg [71], daß ein Austritt des aus Oxalacetat gebildeten Aspartats aus den Mitochondrien nur unter der Wirkung von ATP möglich ist. Untersuchungen an Herzmuskelmitochondrien durch LaNoue [72 - 75] haben kürzlich diese Beobachtungen bestätigt und gezeigt, daß die Glutamat-Aspartat-Austauschreaktion über die Mitochondrienmembran hinweg von einem "energized state of the membrane" abhängt oder möglicherweise sogar eine ATP-verbrauchende Reaktion ist. Es erscheint deshalb als wahrscheinlich, daß der Aspartat-Austritt aus den Mitochondrien den notwendigen Energie-verbrauchenden Schritt des Malat-Aspartat-Zyklus darstellt, der erforderlich ist, wenn reduzierende Äquivalente gegen ein Potentialgefälle in die Mitochondrien transportiert werden.

5. Zusammenfassung

Die Stoffwechselwirkungen des Transaminasenhemmstoffes Aminoxyacetat wurden an der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber mit Hilfe von Metabolitbestimmungen, amperometrischer Sauerstoffmessung und Oberflächenfluorometrie untersucht.

Aminoxyacetat ist ein spezifischer Hemmstoff von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen. Stoffwechselprozesse, bei denen eine Beteiligung von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen obligatorisch ist (z.B. Gluconeogenese und Harnstoffsynthese aus endogenen Aminosäuren oder aus Alanin als exogenem Substrat) wurden durch Aminoxyacetat stark gehemmt (z.B. 90% Hemmung der Gluconeogenese aus Alanin).

Eine unspezifische Bindung von Carbonyl-Gruppen durch Aminoxyacetat ist bei den angewandten Konzentrationen um 0.1 mM unwahrscheinlich, wie durch "Recovery"-Versuche mit α -Ketosäuren bei verschiedenen Aminoxyacetat-Konzentrationen und unterschiedlichem pH gezeigt werden konnte.

Der von Borst postulierte Malat-Aspartat-Zyklus für den Transport von reduzierenden Äquivalenten durch die Mitochondrienmembran basiert auf dem Vorhandensein von Malat-Dehydrogenasen und Glutamat-Oxalacetat-Transaminasen auf beiden Seiten der Membran. Es ist zu fordern, daß dieses Transportsystem wegen der Beteiligung einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Transaminase durch Aminoxyacetat gehemmt werden kann. Die folgenden Stoffwechselwirkungen von Aminoxyacetat stimmen mit der Vorstellung eines blockierten Wasserstofftransportes vom Cytosol in die Mitochondrien überein:

1. Der Ethanolabbau in Anwesenheit von Aminoxyacetat war um 50% vermindert. Unter entsprechenden Versuchsbeding-

ungen hemmte Rotenon und Antimycin A den Äthanolabbau um 72 bzw. 81%. Daraus folgt, daß mindestens zwei Drittel des Äthanol-Wasserstoffes die Mitochondrien über den Malat-Aspartat-Zyklus erreichen. Halbmaximale Hemmung wurde bei einer Aminooxyacetat-Konzentration kleiner als 1 μ M beobachtet.

2. Die Gluconeogenese aus Laktat, Glycerin und Xylitol war in Anwesenheit von Aminooxyacetat stark vermindert (nahezu 100%ige Hemmung bei Laktat als Substrat). Die Gluconeogenese der oxidierten Partner (Pyruvat und Dihydroxyaceton), bei denen kein Wasserstofftransportproblem gegeben ist, wurde durch Aminooxyacetat nicht beeinträchtigt.
3. Der Redoxzustand der Mitochondrien und des Cytosols, ausgedrückt durch Laktat/Pyruvat- und β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotienten sowie durch die Oberflächenfluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide und der oxidierten Flavoproteide, änderte sich unter der Einwirkung von Aminooxyacetat in charakteristischer Weise: Oxidation der mitochondrialen NAD- und FAD-Systeme und Reduktion der cytosolischen NAD-Systeme. Die durch Äthanol und Laktat hervorgerufene Reduktion der mitochondrialen Redoxsysteme konnte durch Aminooxyacetat rückgängig bzw. verhindert werden, während die durch Pyruvat- und Octanoatgabe bedingte Reduktion mitochondrialer Redoxsysteme von Aminooxyacetat nicht beeinträchtigt wurde.

Verzeichnis der Abkürzungen:

AA	Antimycin A
AOA	Aminooxyacetat
B (B/A)	β -Hydroxybutyrat
A (B/A)	Acetoacetat
L (L/P)	Laktat
P (L/P)	Pyruvat
PN	Pyridinnukleotide
FP	Flavoproteide
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	" reduzierte Form
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	" reduzierte Form
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FADH	" reduzierte Form
ATP	Adenosin-triphosphat
α -GP	α -Glycerophosphat
M	molar
mM	10^{-3} molar
μ M	10^{-6} molar
$M \pm S.E.M.$	Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwertes
	$\pm \sqrt{\frac{\sum (x - M)^2}{n \times (n - 1)}}$

Literatur

- (1) Lehninger, A.L.
Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodi-
phosphopyridine nucleotide
J. Biol. Chem. 190 (1951), 345
- (2) Greville, G.D.
Factors affecting the utilization of substrates by
mitochondria
In: Regulation of metabolic processes in mitochondria
Ed. J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E.C.
Slater, BBA Library, 7 (1966), 86
- (3) Bücher, Th., M. Klingenberg
Wege des Wasserstoffes in der lebendigen Organisation
Angew. Chem. 70 (1958), 552
- (4) Zebe, H., A. Delbrück, Th. Bücher
Glycerophosphatdehydrogenase unter zellphysiolo-
gischen Aspekt
Ber. ges. Physiol. exp. Pharmkol. 189 (1957), 115
- (5) Borst, P.
Hydrogen transport and transport metabolites
In: Funktionelle und morphologische Organisation der
Zelle
Ed. P. Karlson, Springer, Berlin (1963), 137
- (6) Devlin, T.M., B.H. Bedell
Effect of acetoacetate on the oxidation of reduced
diphosphopyridine nucleotide by intact rat liver
mitochondria
J. Biol. Chem. 235 (1960), 2134
- (7) Whereat, A.F., M.W. Orishimo, J. Nelson, S.J. Phillips
The localisation of different synthetic systems for
fatty acids in inner and outer mitochondrial mem-
branes from rabbit heart
J. Biol. Chem. 244 (1969), 6498

- (8) Grunnet, N.
Oxidation of extramitochondrial reduced nicotine
adenine dinucleotide by rat liver mitochondria.
Possible role of acyl-SCoA elongation enzymes
Persönliche Kommunikation
- (9) Klingenberg, M., M. Buchholz
Localization of the glycerol-phosphate-dehydrogenase
in the outer phase of the mitochondrial inner mem-
brane
Eur. J. Biochem. 13 (1970), 247
- (10) Carnicero, H.H., C.C. Moore, H.B. Hoberman
Oxidation of glycerol- β -phosphate by the perfused
rat liver
J. Biol. Chem. 247 (1972), 418
- (11) Haslam, J.M., H.A. Krebs
The permeability of mitochondria to oxaloacetate and
malate
Biochem. J. 107 (1969), 659
- (12) Hassinen, I.
Hydrogen transfer into mitochondria in the metabolism
of ethanol
Ann. Med. exp. Fenn. 45 (1967), 35
- (12a) Lumeng, L., E.J. Davis
Demonstration in vitro of competition between added
NADH and glutamate for oxidation by liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 197 (1970), 93
- (13) Forsander, O.A., N.C.R. Rähä
Metabolites produced in the liver during alcohol
oxidation
J. Biol. Chem. 235 (1960), 34

- (14) Ass, M., J. Bremer
Short-chain fatty acid activation in the rat liver.
A new assay procedure for the enzymes and studies on
their intracellular localisation
Biochim. Biophys. Acta 164 (1968),157
- (15) Ernster, L., G. Dallner, G.F. Azzone
Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer
J. Biol. Chem. 238 (1963),1124
- (16) Bryla, J., H. Ksiezak, W. Rode, Z. Kaniuga
Mechanism of inhibition of the mitochondrial electron transport by antimycin A. Effect of surface-active agents on the antimycin A-inhibition curve and availability of sulfhydryl groups of the heart muscle preparation
Biochim. Biophys. Acta 226 (1971),213
- (17) Rieske, J.R.
Changes in oxidation-reduction potential of cytochrome b observed in the presence of antimycin A
Arch. Biochem. Biophys. 145 (1971),179
- (18) Kaniuga, Z., J. Bryla, E.C. Slater
Mechanism of interaction between antimycin and the respiratory chain
In: Metabolic regulation and enzyme action
Ed. A. Sols, S. Grisolia, Academic Pr. London
FEBS Meeting (1969),285
- (19) Kaniuga, Z., J. Bryla, E.C. Slater
Inhibitors around the antimycin-sensitive site in the respiratory chain
In: Inhibitors, tools in cell research
Ed. Th. Bücher, H. Sies, Springer Berlin (1969),282

- (20) Rieske, J.R., W.S. Zaugg
The inhibition by antimycin A of the cleavage of one
of the complexes of the respiratory chain
Biochem. Biophys. Res. 8 (1962), 421
- (21) Dann, O.T., C.E. Carter
Cycloserine inhibition of γ -amino-butyric- α -keto-
glutaric transaminase
Biochem. Pharmacol. 13 (1964), 677
- (22) Wallach, D.P.
Studies on the GABA-pathway
Biochem. Pharmacol. 5 (1961), 323
- (23) Hopper, S., H.L. Segal
Kinetic studies of rat liver glutamic-alanine trans-
aminase
J. Biol. Chem. 237 (1962), 3189
- (24) Hotta, S.S.
Oxidative metabolism of isolated brain mitochondria.
Changes caused by aminooxyacetate
Arch. Biochem. Biophys. 127 (1968), 132
- (25) Rognstad, R., J. Katz
Gluconeogenesis in the kidney cortex, effects of
d-malate and aminooxyacetate
Biochem. J. 116 (1970), 483
- (26) Anderson, J.H., W.J. Nicklas, B. Blank, C. Refino,
J.R. Williamson
Transfer of carbon and hydrogen across the mitochon-
drial membrane in the control of gluconeogenesis
In: Regulation of gluconeogenesis
Ed. H.D. Söling, B. Willms (1971), 293
- (27) Longshaw, I.D., N.L. Bowen, C.I. Pogson
The pathway of gluconeogenesis in the cortex of
guinea-pig kidney
Eur. J. Biochem. 25 (1972), 366

- (28) Corey, E.L., S.W. Britton
Glycogen levels in the isolated liver perfused with
cortico-adrenal extract, insulin and other prepara-
tions
Amer. J. Physiol. 131 (1941), 783
- (29) Trowell, O.A.
Urea formation in the isolated perfused liver of the
rat
J. Physiol. 100 (1942), 432
- (30) Brauer, R.W., R.L. Pesotti, P. Pizzolato
Isolated rat liver preparation. Bile production and
other basic properties
Proc. Soc. exp. Biol. 78 (1951), 174
- (31) Miller, L.L., C.G. Bly, M.L. Watson, W.B. Bale
The dominant role of the liver in plasma protein
synthesis. A direct study of the isolated perfused
rat liver with the aid of lysine- C^{14}
J. exp. Med. 94 (1951), 431
- (32) Schimmassek, H.
Perfusion of isolated rat liver with a semi-synthetic
medium and control of liver function
Life Sciences 11 (1962), 629
- (33) Scholz, R., Th. Bücher
Hemoglobin-free perfusion of rat liver
In: Control of energy metabolism
Ed. B. Chance Academic Pr. N.Y. (1965), 393
- (34) Scholz, R.
Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Ratten-
leber und Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung
Habilitationsschrift (1967)

- (35) Schnitger, H., R. Scholz, Th. Bücher, D.W. Lübbers
Comparative fluorimetric studies on rat liver in vivo
and on isolated, perfused hemoglobin-free liver
Biochem. Z. 341 (1965), 334
- (36) Scholz, R., R.G. Thurman, J.R. Williamson, B. Chance,
Th. Bücher
Flavin and pyridine nucleotide-oxidation-reduction
changes in perfused rat liver
J. Biol. Chem. 244 (1969), 2317
- (37) Lübbers, D.W., M. Kessler, R. Scholz, Th. Bücher
Cytochrome reflection spectra and fluorescence of the
isolated, perfused, hemoglobin-free rat liver during
a cycle of anoxia
Biochem. Z. 341 (1965), 346
- (38) Brauser, B.
Ein Gerät zur höchstempfindlichen Differentialspektro-
photometrie mit dem Rapidspektroskop
Z. anal. Chem. 237 (1968), 8
- (39) Scholz, R.
Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der
hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
Sonderdruck aus 3. Konferenz der Gesellschaft für
Biol. Chemie in Oestrich/Rheingau (1967)
- (40) Krebs, H.A., H. Henseleit
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tier-
körper
Z. Physiol. Chem. 210 (1932), 33
- (41) Fischer, A., G. Molnar, L. Takacs
Kreislauf und O_2 -Verbrauch der Leber bei experimen-
teller Zirrhose
Acta Med. Acad. Sci. Hung. 17 (1961), 33

- (42) Clark, L.C.
Monitoring and control of blood tissue O_2 tensions
Amer. Soc. Art. Int. Organe 2 (1956), 41
- (43) Warburg, O.
Wasserstoff übertragende Fermente
Verlag: W. Sängner Berlin (1948), 21
- (44) Grunst, J.
Über den Anoxie-Zyklus bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
Inaugural-Dissertation (1967)
- (45) Theorell, H.
Das gelbe Oxydationsferment
Biochem. Z. 278 (1935), 263
- (46) King, T.
In: Flavins and flavoproteins
Ed. E.C. Slater, Elsevier Amsterdam (1966), 522
- (47) Chance, B., B. Schoener
Fluorometric studies of flavin component of the respiratory chain
In: Flavins and flavoproteins
Ed. E.C. Slater, Elsevier Amsterdam (1966), 510
- (48) Chance, B., L. Ernster, P. Garland, C.P. Lee, P.A. Light, T. Ohnishi, C.I. Ragan, D. Wong
Flavoproteins of the mitochondrial respiratory chain
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57 (1967), 1498
- (49) Chance, B., I.Y. Lee
In: Electron transport and energy conservation
Ed. J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E.C. Slater, Adriat. Edit. Bari (1970), 101

- (50) Chance, B., P. Cohen, F. Jöbsis, B. Schoener
Intracellular oxidation-reduction states in vivo.
The microfluorometry of pyridine nucleotide gives a
continuous measurement of the oxidation state
Science 137 (1962),499
- (51) Warburg, O.
Chemische Konstitution von Fermenten
Erg. Enzymforschung 7 (1938),210
- (52) Bergmeyer, H.K.
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie (1970),1367
- (53) Bücher, Th.
The state of the DPN system in liver. An analysis of
pyridine nucleotide levels, surface fluorescence,
and redox potentials of indicator metabolite couples
in the hemoglobin-free perfused rat liver
In: Pyridine nucleotide dependent dehydrogenases
Ed. H. Sund, Springer Verlag Berlin (1970),439
- (54) Brauser, B., Th. Bücher, H. Sies, H. Versmold
Control of mitochondrial activity by metabolites in
the hemoglobin-free perfused liver
In: Molecular basis of biological activity
Ed. K. Gaede, B.L. Horecker, W.J. Whelan, Academic Pr.
New York (1972),197
- (55) Williamson, J.R., R. Scholz, R.G. Thurman, B. Chance
Transport of reducing equivalents across the mito-
chondrial membrane in rat liver
In: The energy level and metabolic control in mito-
chondria
Ed. S. Papa, J.M. Tager, E. Quagliariello, E.C. Slater
Adriat. Edit. Bari (1969),411
- (56) Lieber, C.S.
Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system
J. Biol. Chem. 245 (1970),2505

- (57) Thurman, R.G., H.G. Ley, R. Scholz
Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase
Eur. J. Biochem. 25 (1970),420
- (58) Leloir, L.F., J.M. Munoz
Ethyl alcohol metabolism in animal tissues
Biochem. J. 32 (1938),299
- (59) Rabinowitz, J.G., E.E. Snell
The vitamin B₆ group, distribution of pyridoxal, pyridoxine and pyridoxamin in some natural products
J. Biol. Chem. 176 (1948),1157
- (60) Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, (1960),424
- (61) Klingenberg, M., Th. Bücher
Biological Oxidations
Ann. Rev. Biochem. 29 (1960),669
- (62) Pette, D., W. Luh
Constant proportion groups of multiflocated enzymes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8 (1962),283
- (63) Chappell, J.B.
Systems used for the transport of substrates into mitochondria
Br. med. Bull. 235 (1960),150
- (64) Quagliriello, S. Papa, A.J. Mejer, J.M. Tager
Substrate transport in mitochondria and control of metabolism
FEBS Symposium 17 (1969),335
- (65) Büttner, H.
Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase-Aktivität in Leber und Niere der Ratte
Biochem. Z. 341 (1965),300

- (66) Williamson, J.R., A. Jakob, C. Refino
Control of the removal of reducing equivalents
from the cytosol in perfused rat liver
J. Biol. Chem. 246 (1971),7632
- (67) Müllhofer, G., D. Kunntzen, S. Hesse, Th. Bücher
Gluconeogenesis from l-lactate-2-T-2-C¹⁴ in
perfused rat liver
FEBS lett. 4 (1969),33
- (68) Williamson, J.R., R. Scholz, E.T. Browning,
R.G. Thurman, M.H. Fukami
Metabolic effects of ethanol in perfused rat liver
J. Biol. Chem. 244 (1969),5044
- (69) Williamson, J.R.
Calculation of metabolic concentrations in the cyto-
sol and mitochondria of rat liver
In: The energy level and metabolic control in mito-
chondria
Ed. S. Papa, J.M. Tager, E. Quagliariello, E.C.
Slater, Adriat. Edit. Bari (1969),411
- (70) Nohl, H., R. Scholz
Unveröffentlichte Beobachtungen
- (71) Klingenberg, M.
Redox-Reaktionen in Mitochondrien
In: Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen
(1962),163
- (72) La Noue, K.F., J.R. Williamson
Interrelationships between malate-aspartate shuttle
and citric acid cycle in rat heart mitochondria
Metabolism 20 (1971),119
- (73) La Noue, K.F., J.R. Williamson
Control of the malate-aspartate shuttle in rat
liver mitochondria
Colloquium on bioenergetics, Pugnochioso, Italy
(1970)

- (74) Williamson, J.R., B. Safer, K.F. La Noue, C. M. Smith, E. Walajtys
Mitochondrial-cytosolic interactions in cardiac tissue: Role of the malate-aspartate cycle in the removal of cytosolic NADH from the cytosol
In: Rate control of biological processes
Cambridge University Press (1973), 241
- (75) La Noue, K.F., J.G. Hemington
Role of phosphate in the transport of aspartate across the mitochondrial membrane
9th International Congress of Biochemistry
Abstract Stockholm (1973), 244

Meinem verehrten Lehrer, Prof. Dr. med. Roland Scholz danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit und für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Besonderen Dank zolle ich Herrn Dr. R.G. Thurman, der mir zu Beginn meiner Labortätigkeit beim Kennenlernen biochemischer Techniken mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mit großem Dank gedenke ich der qualifizierten Unterstützung von Frl. U. Schwabe, Frl. E. Müller, Frau I. Wohlrab und Herrn A. Schallweg, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Lebenslauf:

Am 27. Februar 1948 wurde ich in München als Sohn des Arztes Dr. med. Rolf Zimmer und seiner Ehefrau Irmgard Zimmer, geb. Schmucker, geboren.

Im Herbst 1954 wurde ich in Solln eingeschult. Nach vier Jahren Volksschule legte ich im Gymnasium zu Icking die Aufnahmeprüfung ab. Dort bestand ich im Jahre 1967 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Medizinstudium. Zwei Semester später legte ich das "Vorphysikum" und nach weiteren drei Semestern das "Physikum" ab. Im Sommersemester 1970 begann ich bei Priv. Doz. Dr. Scholz am Physiologisch-Chemischen Institut mit Vorarbeiten zu der vorliegenden Dissertation.

Neben meiner wissenschaftlichen Tätigkeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse der klinischen Semester, zudem arbeitete ich insgesamt 14 Wochen im Rahmen der Famulatur am Städtischen Krankenhaus Harlaching, an der von Hauner'schen Kinderklinik und an der Dermatologischen Klinik in München.

Am 10.12.1973 bestand ich in München nach insgesamt 12 Fachsemestern die "Ärztliche Prüfung". Seit 1. Februar 1974 arbeite ich als Medizinalassistent am Physiologisch-Chemischen Institut im Labor von Prof. Scholz.

